

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LAUANDA MILANEZ CARVALHO

TOPOGRAFIA TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS-MÃES E FILHAS DE
Saccharomyces cerevisiae ANTES E APÓS O ESTRESSE POR
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

VITÓRIA

2017

LAUANDA MILANEZ CARVALHO

**TOPOGRAFIA TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS-MÃES E FILHAS DE
Saccharomyces cerevisiae ANTES E APÓS O ESTRESSE POR
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Machado Bueno Fernandes.

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

Carvalho, Lauanda Milanez, 1990 -
C331t Topografia tridimensional de células-mães e filhas de *Saccharomyces cerevisiae* antes e após o estresse por alta pressão hidrostática / Lauanda Milanez Carvalho - 2017
72 f. : il.

Orientador: Antônio Alberto Ribeiro Fernandes.

Coorientador: Patrícia Machado Bueno Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Parede celular. 2. Longevidade. 3. *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Biotecnologia. 5. Microscopia de Força Atômica. I. Fernandes, Antônio Alberto Ribeiro. II. Fernandes, Patrícia Machado Bueno. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

LAUANDA MILANEZ CARVALHO

**TOPOGRAFIA TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS-MÃES E FILHAS DE
Saccharomyces cerevisiae ANTES E APÓS O ESTRESSE POR
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Apresentada em 03 de julho de 2017.

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof.^a Dr.^a Patrícia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Prof. Dra. Flávia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno

Prof. Dr. Ronaldo Sérgio de Biasi
Instituto Militar de Engenharia
Membro externo

VITÓRIA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

"Topografia tridimensional de células-mães e filhas de *Saccharomyces cerevisiae* antes e após o estresse por alta pressão hidrostática"

Lauanda Milanez Carvalho

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes (UFES)

Orientador

Profª. Drª. Patrícia Machado Bueno Fernandes (UFES)

Co-orientadora

Profª. Drª. Flávia de Paula (UFES)

Membro Interno

Prof. Dr. Ronaldo Sergio de Biasi (IME)

Membro Externo

Vitória-ES, 03 de Julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado condições de chegar até aqui, por ter me ajudado em todos os momentos, por nunca ter me deixado só e por sempre ter feito o meu caminhar suave. A Ele toda glória!

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade concedida. Sou muito grata!

Às agências de fomento: CAPES, CNPq, FAPES e FINEP, pelo apoio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Alberto Fernandes e Profa. Dra. Patrícia Fernandes, por terem me recebido no laboratório, pela paciência em me ajudar e por todos os ensinamentos. Sou grata por sempre nos lembrarem do privilégio que é estudar em uma universidade federal, principalmente cursando uma pós-graduação. Muito obrigada, professores!

À Prof. Dra. Flávia de Paula e ao Prof. Dr. Ronaldo Sergio de Biasi por aceitarem o convite para fazer parte da banca de defesa de dissertação.

A todos os colegas do LBAA, que foram muito importantes nessa trajetória, me ajudando, seja diretamente no trabalho, ou com palavras de ânimo e incentivo nos momentos difíceis. Agradeço em especial à Ane e Raíssa, que estiveram comigo desde o início, sempre com boas discussões, boas ideias e por estarem juntas mesmo em momentos delicados. Também agradeço à Brígida, à Fernanda Bravim por me acolherem e me instruírem no laboratório e ao Tércio por me ajudar com o AFM. À Luíza Adami que também esteve sempre por perto com suas contribuições, à Ana Carolina, Marlonni e Maurício, por terem me acompanhado no laboratório até tarde da noite por várias vezes. Sou muito grata!

Agradeço aos meus pais, Vilmar e Sônia, e minha irmã, Laryssa, pela paciência, pelo incentivo e por acreditarem em mim. Só nós sabemos o quanto foi difícil para chegar até aqui, mas mais uma vez Deus nos fez vitoriosos! Obrigada por tudo.

Ao meu noivo, Peterson, pela ajuda com o programa de representação gráfica, pelo incentivo, paciência, por sempre me ouvir, me dar boas ideias, por não me deixar desanimar e estar sempre comigo. Agradeço de coração. Deus nos fez vitoriosos!

Às minhas amigas e irmãs Dayane, Flávia, Sâmila e Switiney e à minha segunda mãe, Rita, pela preocupação, pelo incentivo e pelas orações. Deus nos fez vitoriosas!

Às minhas amigas Dayana, Glória, Jeane, Lúgia e Maíra, por torcerem sempre por mim, me animando e me incentivando sempre. Muito obrigada.

Mas esforçai-vos, e não desfaleçam as vossas mãos; porque a vossa obra tem uma recompensa.

II Crônicas 15:7

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae, uma levedura com larga aplicação econômica e biotecnológica é um organismo modelo em estudos de estresse e longevidade. Segundo estudos, organismos que melhor respondem ao estresse alcançam maior tempo de vida. O estresse por alta pressão hidrostática (HHP) gera resposta celular semelhante à de outros estresses sofridos por leveduras em dornas de fermentação. O microscópio de força atômica (AFM) é uma ferramenta que gera imagens tridimensionais, e fornece dados precisos sobre as características morfológicas e químicas das leveduras. O objetivo do trabalho foi analisar, utilizando AFM, características morfológicas de células-mães e filhas de *S. cerevisiae* e após tratamento por HHP de 100 MPa por 30 minutos. Após o tratamento foram feitas imagens em AFM em modo de leitura de contato intermitente e modo fase. Dados de variação relativa de rugosidade entre o maior e o menor valor encontrados foram obtidos a partir de 11 células em cada grupo experimental, sendo plotados gráficos de caixa. Foi feito teste de calibração do AFM em lamínula de vidro e foi desenvolvido um programa para a criação de representações gráficas de leveduras mães e filhas à pressão ambiente e após aplicação de 100 MPa a partir das médias de rugosidade obtidas nas leituras. O teste de calibração aumentou a confiabilidade dos dados obtidos. Células-mães e filhas a 0,1 MPa apresentaram distribuição de rugosidade dispersa, porém as células-filhas apresentaram menor uniformidade (29-51%) da superfície do que as mães (18-41%). As células-mães após tratamento por HHP a 100 MPa mostraram ter maior uniformidade do perfil de rugosidade do que a 0,1 MPa. Células-filhas após tratamento por HHP também mostraram maior uniformidade em seu perfil de rugosidade do que à pressão ambiente. Após a aplicação de 100 MPa de HHP, células-filhas mostraram sofrer mais os efeitos do estresse, tornando-se mais uniformes do que as células-mães submetidas às mesmas condições. A maior uniformidade da superfície das células-mães e filhas após tratamento por HHP pode ser devida à sua compressão durante o processo de pressurização. A partir das médias de rugosidade foram montadas representações gráficas tridimensionais das leveduras (estáticas e animadas). O programa desenvolvido mostrou-se eficaz, apresentando de forma simples e visual os dados numéricos do trabalho. Assim, com os dados obtidos foi possível observar que o piezoestresse afeta de maneira diferentes as células-mães e filhas de *Saccharomyces cerevisiae* e isso pode ser devido tanto à própria composição da parede celular dessas leveduras, quanto a fatores moleculares envolvidos na resposta ao estresse. Estes e outros resultados podem auxiliar na elucidação dos mecanismos utilizados por *S. cerevisiae* na resposta ao estresse.

Palavras-chave: Parede celular. Rugosidade. Longevidade. Levedura. Biotecnologia. Microscopia de força atômica.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae, a yeast with several economic and biotechnological application, is a model organism in studies of stress and longevity. According to studies, organisms that respond better to stress reach longer life. The high pressure hydrostatic (HHP) stress generates cellular response similar to the other stresses suffered by yeasts in fermentation tanks. The atomic force microscope (AFM) is a tool that generates three-dimensional images, providing accurate data on the morphological and chemical characteristics of yeasts. The objective of this study was to analyze the morphological characteristics of mother and daughter cells of the *S. cerevisiae* and after treatment by HHP to 100 MPa for 30 minutes. After the treatment, images were made in AFM in intermittent contact reading mode and phase mode. Relative roughness variation between the highest and lowest value found obtained from 11 cells in each experimental group, being made boxplots. An AFM calibration test was performed on glass coverslip and also was developed a program to create graphic representations of mother and daughter yeasts at ambient pressure and after application to 100 MPa from the averages of roughness obtained in the readings. The calibration test increased the reliability of the obtained data. Mothers and daughters cells at 0,1 MPa presented a dispersed roughness distribution, but the daughter cells presented lower uniformity (29-51%) of the surface than the mothers (18-41%). Mother cells after treatment by HHP to 100 MPa was showed to have greater roughness uniformity than at 0.1 MPa. Daughter cells after treatment by HHP also showed greater uniformity in their roughness profile than it at ambient pressure. After application of 100 MPa to HHP, daughter cells was showed to suffer more from the effects of stress, being more uniform than the cells submitted to the same conditions. The increased uniformity of the surface of the mother cells and daughters after treatment by HHP may be due to their compression during the pressurizing process. From the roughness averages, three-dimensional graphical representations of the yeasts (static and animated) was assembled. The program was effective, presenting in a simple and visual form the numerical data of the work. Thus, with the data obtained, it was possible to observe that the piezo stress differently affects the mother cells and daughters of *Saccharomyces cerevisiae* and this may be due to both the cell wall composition of these yeasts and to the molecular factors involved in the stress response. These and other results may aid in the elucidation of the mechanisms utilized by *S. cerevisiae* in stress response.

Key words: Cell wall. Roughness. Longevity. Yeast. Biotechnology. Atomic force microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema mostrando os diferentes compostos constituintes da parede celular de fungos (WALKER; WHITE, 2011 – Traduzida e adaptada).....	18
Figura 2: Imagens representativas de <i>S. cerevisiae</i> . (A) ao microscópio óptico, aumento de 1000x – próprio autor. (B) ao microscópio eletrônico de varredura – BS: cicatriz de brotamento (do inglês <i>bud scar</i>); BirS: cicatriz de nascimento (do inglês <i>birth scar</i>) (OSUMI, 1998 – Adaptada)	23
Figura 3: O esquema mostra com as imagens são formadas no AFM. Uma ponta fina varre a superfície da amostra, à esquerda, e o seu movimento a cada passagem pela superfície gera um perfil de linha bidimensional. Em seguida, os perfis de linha são combinados para criar uma imagem tridimensional da superfície, à direita (WEST, 2006)	24
Figura 4: Representação esquemática do funcionamento do AFM (OLIVEIRA et al., 2012 – Traduzida)	25
Figura 5: Esquema do comportamento do cantilever durante as leituras no AFM. (a) No modo contato a ponta “desliza” sobre a amostra. (b) No modo não-contato a ponta vibra sobre a amostra (DUFRENE, 2008 – Adaptada)	26
Figura 6: Funcionamento do modo fase. Quando o cantilever passa sobre a região amarela a mudança de fase entre o sinal emitido pelo cantilever e o sinal recebido pelo sensor do AFM muda, ocorrendo um <i>delay</i> entre esses sinais (WEST, 2006 - traduzida)	27
Figura 7: Identificação das células através do seu comprimento. Quando a linha de análise (AB) é delimitada, o comprimento da levedura pode ser determinado	34
Figura 8: Fluxograma das etapas metodológicas realizadas	35
Figura 9: Imagem obtida em AFM de população total de <i>S. cerevisiae</i> . (A) imagem de altura. (B) representação tridimensional da imagem (A). Os asteriscos vermelhos indicam células com presença de cicatrizes visíveis e que tiveram seus dados registrados. As demais foram descartadas.....	38
Figura 10: Diferentes populações de <i>S. cerevisiae</i> analisadas. À esquerda: imagens de topografia e à direita: imagens tridimensionais da imagem apresentada à direita. (A)	

Células-mães a 0,1 MPa; (B) Células-mães após 100 MPa; (C) Células-filhas a 0,1 MPa; (D) Células-filhas após 100 MPa.....40

Figura 11: Comparação da variação de rugosidade de células-mães e filhas de *S. cerevisiae* a 0,1 MPa. Os círculos indicam os valores encontrados e o asterisco (*) indica um *outlier*41

Figura 12: Comparação da variação de rugosidade de células-mães de *S. cerevisiae* antes e após o tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min. Os círculos indicam os valores encontrados e o asterisco (*) indica um *outlier*.....42

Figura 13: Comparação de variação da rugosidade de células-filhas de *S. cerevisiae* antes e após o tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min. Os círculos indicam os valores encontrados e os asteriscos (*) indicam a ocorrência de *outliers*.....43

Figura 14: Comparação de variação de rugosidade de células-mães e filhas *S. cerevisiae* após tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min. Os círculos indicam os valores encontrados e os asteriscos (*) os *outliers*.....44

Figura 15: Representação gráfica de célula-mãe de *S. cerevisiae* à pressão ambiente. Aumento de dez mil vezes. C. maior: comprimento maior. C. menor: comprimento menor46

Figura 16: Representação gráfica de célula-mãe de *S. cerevisiae* após tratamento por alta pressão hidrostática de 100 MPa por 30 minutos. Aumento de dez mil vezes. C. maior: comprimento maior. C. menor: comprimento menor46

Figura 17: Representação gráfica de célula-filha de *Saccharomyces cerevisiae* à pressão ambiente. Aumento de dez mil vezes. C. maior: comprimento maior. C. menor: comprimento menor.....47

Figura 18: Representação gráfica de célula-filha de *S. cerevisiae* após estresse por alta pressão hidrostática de 100 MPa por 30 min. Aumento de dez mil vezes. C. maior: comprimento maior. C. menor: comprimento menor47

Figura B-1: Diferenças na visualização de detalhes das imagens de modo fase com aumentos distintos. Imagens com aumento maior (B) revelam mais detalhes do que imagens com aumento menor (A). À esquerda: imagens de altura e à direita: imagens de modo fase.....57

Figura B-2: Imagens de modo fase que não tiveram boa leitura. Em A, B e C: imagens topográficas de altura e em A', B' e C' suas respectivas imagens de fase58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Organização dos dados e cálculo de médias para Ra, Rz e Rq.....	36
Tabela 2: Variação relativa de rugosidade em lamínula de vidro	37
Tabela A-1: Valores de rugosidade e variação relativa de rugosidade de lamínula de vidro	55
Tabela C-1: Valores de rugosidade, variação relativa e médias de rugosidade de células-mãe sem tratamento por HHP	59
Tabela C-2: Valores de rugosidade, variação relativa e médias de rugosidade de células-mãe após tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min	62
Tabela C-3: Valores de rugosidade, variação relativa e médias de rugosidade de células-filhas sem tratamento por HHP	65
Tabela C-4: Valores de rugosidade, variação relativa e médias de rugosidade de células-filhas após tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min	68

LISTA DE SIGLAS

AFM: Microscópio de força atômica (do inglês *Atomic Force Microscopy*)

D.O.: Densidade óptica

HHP: Alta pressão hidrostática (do inglês *High Hydrostatic Pressure*)

kHz: Quilohertz

min: Minuto

mL: Mililitro

mM: Milimolar

μL: Microlitro

μm: Micrômetro

μM: Micromolar

MPa: Megapascal

nm: Nanômetro

N/m: Newton por metro

PBS: Tampão fosfato-salino

pH: Potencial hidrogeniônico

Ra: Rugosidade aritmética

rpm: Rotações por minuto

Rq: Rugosidade média quadrática

Rz: Rugosidade média de dez pontos

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

YEPD: Extrato de levedura, peptona e dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – ASPECTOS GERAIS	15
1.1.1 Características da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.1.2 Envelhecimento e longevidade celular.....	18
1.2 ESTRESSE	19
1.2.1 Alta Pressão Hidrostática como modelo de estresse	21
1.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.3.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)	24
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 ORGANISMOS UTILIZADOS E CRESCIMENTO CELULAR.....	31
3.2 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS-MÃE E FILHAS	32
3.3 TRATAMENTO COM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	33
3.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	33
3.5 TESTE DE CALIBRAÇÃO DO AFM	35
3.6 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LEVEDURA.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 TESTE DE CALIBRAÇÃO COM LAMÍNULA DE VIDRO.....	37
4.2 EFEITOS DA HHP NA PAREDE CELULAR DE CÉLULAS-MÃES E FILHAS	37
4.3 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS LEVEDURAS	45
5 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICE A – Tabela com dados brutos de rugosidade de lamínula de vidro	55
APÊNDICE B – Utilização de modo fase em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	56
APÊNDICE C – Tabela com dados brutos de rugosidade de parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	59
APÊNDICE D – Código fonte do programa para representação gráfica da levedura.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* – ASPECTOS GERAIS

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie de fungo unicelular, que normalmente possui tamanho aproximado de 5-10 µm em seu comprimento maior e 1-7 µm em seu comprimento menor. Ela pertence à família Saccharomycetaceae, à subfamília Saccharomycetoidea e ao gênero *Saccharomyces*. Os integrantes desse gênero possuem características peculiares que os diferenciam, como alta capacidade fermentativa, divisão celular por gemulação, ou brotamento, e ainda possuem ascósporos ovais que não são liberados durante a reprodução (BRAVIM; FERNANDES, 2009).

Devido à capacidade dos organismos da família Saccharomycetaceae de produzir etanol e gás carbônico a partir da quebra de moléculas de açúcar (processo chamado de fermentação), eles são muito utilizados na fabricação de pães, bebidas destiladas e biocombustível. A própria *S. cerevisiae* é tida como o mais antigo organismo domesticado da história. Isso se deve ao fato de ser usada há aproximadamente 9000 anos pelos chineses e entre 7000 e 3000 anos pelos povos às margens do Mar Mediterrâneo na fabricação de vinhos, cerveja e pães (CAVALIERI et al., 2003; BRAVIM; FERNANDES, 2009).

A constante permanência das leveduras junto ao homem, somada ao avanço tecnológico, permitiu que muito se conhecesse a respeito desses organismos, principalmente de *S. cerevisiae*, que foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma totalmente sequenciado e se tornou um organismo modelo de célula eucarionte (GOFFEAU, et al., 1996). Isso porque além do fácil cultivo em laboratório, rápido crescimento, não patogenicidade e fácil manipulação genética, a espécie *S. cerevisiae* apresenta mecanismos de replicação, recombinação, divisão celular, resposta ao estresse e metabolismo que se mantêm conservados nos organismos eucariotos. A espécie ainda tem sido apontada como um modelo em estudos sobre envelhecimento (BITTERMAN et al., 2003) e em estudos de ecologia e genética evolutiva (LANDRY et al., 2006; MARSIT; DEQUIN, 2015).

Adicionalmente, a levedura *S. cerevisiae* tem grande destaque nas pesquisas biotecnológicas, sendo utilizada no melhoramento da produção de bebidas alcóolicas; na produção de biocombustíveis a partir do caldo da cana-de-açúcar (etanol de primeira geração) e a partir de resíduos celulósicos (etanol de segunda geração); como fonte de alimento para o homem e animais, devido ao seu alto valor proteico, além do uso na fabricação de pães; também é utilizada pela indústria farmacêutica na fabricação de antibióticos, na produção de vacinas contra hepatite B, na produção de insulina e tantos outros usos tão importantes para o bem-estar da sociedade (FERNANDES et al., 2009).

1.1.1 Características da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Os fungos, de forma geral, apresentam parede celular bem definida, que fica em contato com o meio externo, sendo a primeira defesa desses organismos contra fatores ambientais e estresses físicos, permitindo ainda o transporte de materiais tanto para fora quanto para dentro da célula, além de também ser responsável pela manutenção da sua forma. Além disso, a parede celular age como uma barreira contra o turgor da própria célula, como um arcabouço para proteínas extracelulares e também tem papel importante na adesão célula-célula (BRUL et al., 2000; KLIS et al., 2006). Em *S. cerevisiae* a parede celular constitui aproximadamente 15-30% do peso seco do organismo (ORLEAN, 1997; BRUL et al., 2000).

A parede celular de fungos possui uma complexa composição química, podendo se diferenciar entre diversos grupos taxonômicos e até mesmo entre espécies (RUIZ-HERRERA, 2012). Somando-se a isso, estudos realizados ao longo dos anos mostraram que a composição química da parede de uma espécie de fungo pode mudar dependendo da idade da cultura, das condições ambientais de crescimento, da utilização de meios sólidos ou líquidos, das fontes de carbono e de nitrogênio, da concentração de íons, da temperatura, do pH, da iluminação e da adição de diferentes compostos, dentre outros (KLIS et al., 2006; RUIZ-HERRERA, 2012).

Seus componentes são polissacarídeos, com aproximadamente 80% do peso seco da parede; proteínas, com 3% - 20%; lipídios, em torno de 1% - 10%, e, em pequenas quantidades, pigmentos e sais inorgânicos (RUIZ-HERRERA, 2012). Em leveduras, os principais carboidratos encontrados são β -glicanos, responsáveis por garantir a rigidez, enquanto que as manoproteínas são os compostos proteicos mais abundantes, determinando a porosidade da parede celular. Além disso, são encontrados também alguns lipídios, fosfatos inorgânicos e quitina (figura 1).

Dentre os polissacarídeos constituintes da parede celular dos fungos de forma geral, encontram-se os glicanos, as mananas e a quitina (RUIZ-HERRERA, 2012). Os β -1,3-glicanos são abundantemente distribuídos na parede celular desses organismos e apresentam formato de microfibrilas que se ligam covalentemente a β -1,6-glicanos, formando um polissacarídeo ramificado (LESAGE; BUSSEY, 2006; RUIZ-HERRERA, 2012), como pode ser observado na figura 1, que esquematiza os componentes presentes na parede celular de fungos. A quitina, por sua vez, ocorre em pequenas quantidades, porém também é um componente presente em todos os organismos do reino Fungi, o que faz dela um componente estrutural básico da parede celular fúngica (RUIZ-HERRERA, 2012). Em leveduras ela é encontrada em maior concentração nas cicatrizes dos brotos na forma de anéis (ORLEAN, 1997; WALKER; WHITE, 2011; RUIZ-HERRERA, 2012). Além disso, sabe-se ainda que a resistência mecânica da parede é devida, principalmente, à quitina ligada à camada mais interna de β -1,3-glucano (OSUMI et al., 1998; DAGUE et al., 2010).

Já as proteínas encontradas na parede celular dos fungos estão associadas a carboidratos e sua importância na parede celular está em sua atividade hidrolásica, que permite a quebra de nutrientes (RUIZ-HERRERA, 2012), na degradação da parede durante o crescimento do organismo, na morfologia (ADAMS, 2004) e também, em alguns casos, podem participar nos processos de reparo da parede (KLIS et al., 2006). Outro exemplo são as floculinas, glicoproteínas que em leveduras estão presentes na superfície da parede celular permitindo a interação da célula com o meio externo, como a adesão celular, interação sexual e formação de biofilmes (DRANGINIS et al., 2007).

Com relação à estrutura da parede celular dos fungos, existe uma camada de microfibrilas de polissacarídeos imersas numa matriz amorfa, constituída do restante dos componentes da parede. Nesse caso, as fibras proporcionam a estrutura e a

resistência à tensão, enquanto que a matriz oferece resistência aos estresses do ambiente, além de oferecer proteção às fibras à fraturas (RUIZ-HERRERA, 2012).

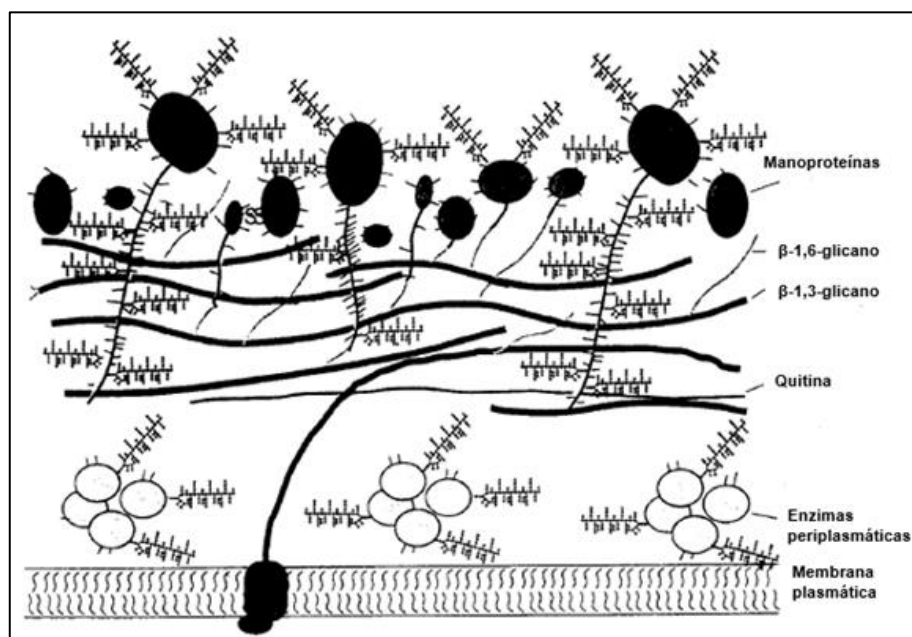


Figura 1: Esquema mostrando os diferentes compostos constituintes da parede celular de fungos (WALKER; WHITE, 2011 – Traduzida e adaptada)

1.1.2 Envelhecimento e longevidade celular

Longevidade e envelhecimento são conceitos não sinônimos, mas que muitas vezes são vistos com certa sobreposição. A longevidade pode ser entendida como um aumento do tempo de vida de células, ou de um organismo como um todo (FONTANA et al., 2010), enquanto que o envelhecimento é um processo gerado pelo acúmulo de danos causados por diversas mutações que ocorrem no material genético dos seres vivos (FONTANA et al., 2010; KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011). O grande número de danos faz com que a célula não consiga mais proliferar-se, entrando então numa fase chamada de senescência e posteriormente, se encaminham para a morte (LINDSTROM; GOTTSCHLING, 2009; CAMERONI et al., 2010).

São grandes os esforços para tentar esclarecer os mecanismos relacionados com a longevidade e mais uma vez a *S. cerevisiae* tem se mostrado um excelente organismo modelo em pesquisas nessa área (KAEBERLEIN, 2010). Foram estabelecidos dois

modelos de envelhecimento para leveduras: (1) o envelhecimento replicativo, que é definido pelo número de mitoses que uma levedura já realizou (e consequentemente o número de células-filhas geradas antes da senescência), e (2) o envelhecimento cronológico, no qual o tempo de vida das células é definido pelo quanto ela pode sobreviver sem se dividir na fase estacionária (LINDSTROM; GOTTSCHLING, 2009; KAEBERLEIN, 2010).

Vários trabalhos têm relacionado os mecanismos de resposta ao estresse aos processos de longevidade (KAEBERLEIN et. al., 2005; KAEBERLEIN, 2010; KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2011). Grande parte deles têm mostrado que estresses, como o alcóolico, produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos às mitocôndrias dos organismos e esses danos são acumulados, contribuindo para o envelhecimento cronológico (KAEBERLEIN, 2010). Apesar disso, esses danos oxidativos, que atingem mitocôndrias e proteínas, produzem nas células intervenções de resposta que também aumentam o tempo de vida cronológico, ou seja, a longevidade, e assim também promovem a resistência ao referido estresse (FABRIZIO; LONGO, 2003). Reforçando a íntima relação entre os mecanismos de tolerância ao estresse, a longevidade e o envelhecimento, é sugerido ainda que organismos que melhor respondem aos estímulos estressantes alcançam maior tempo de vida (KIRKWOOD; AUSTAD, 2000)

Dessa forma, elucidar os mecanismos envolvidos na resposta ao estresse e também no aumento da longevidade das células torna-se uma importante ferramenta no entendimento do funcionamento celular como um todo, possibilitando a abertura de novas pesquisas aplicadas tanto à saúde quanto ao agronegócio e que, consequentemente, culminem no desenvolvimento de novas tecnologias.

1.2 ESTRESSE

O estresse pode ser entendido como qualquer mudança ambiental que gere uma perturbação celular, podendo afetar seu funcionamento ideal. Todos os tipos de células, desde procariontes até eucariontes multicelulares, estão sujeitas a um estímulo estressante e são capazes de responder a ele, promovendo, por exemplo, a

modificação de regulação da expressão gênica, ajuste de metabolismo e de crescimento celular, mantendo-as protegidas e adaptadas ao meio em que estão inseridas (HOHMANN; MAGER, 2003; FERNANDES, 2008; BRAVIM et al., 2010).

As leveduras, por serem organismos de vida livre, estão constantemente suscetíveis ao estresse. Além disso, durante a produção de bebidas fermentadas por *S. cerevisiae*, as células estão sujeitas a vários eventos estressantes, como o estresse osmótico, térmico, de pressão hidrostática e até mesmo o estresse alcóolico (ATTFIELD, 1997). Devido a isso, é de extrema importância que esses organismos sejam capazes de responder, se adaptar a situações adversas, criando tolerância a esses estímulos, ou até mesmo tornando-se resistentes, a fim de manterem-se vivas.

Quando se fala em resistência é preciso destacar uma capacidade que *Saccharomyces cerevisiae* apresenta: as leveduras dessa espécie ao sofrerem um estímulo estressante não letal conseguem adaptar-se e tornar-se resistentes, suportando estímulos que antes seriam mortais – essa é a chamada resposta adaptativa. Como exemplo, Palhano et al. (2004) aplicaram inicialmente uma pressão de 220 MPa por 30 minutos numa cultura de leveduras, obtendo a morte de todas as células, visto que o valor de pressão aplicado era letal para esses organismos. Em outro ensaio os pesquisadores aplicaram uma pressão não letal, de 50 MPa por 30 minutos, em suas leveduras. Posteriormente essa cultura foi incubada a pressão ambiente (0,1 MPa) por 15 minutos e ao fim estressada novamente com a pressão de 220 MPa. Curiosamente, ao fim do experimento grande parte das células estava viva, mostrando que um estresse brando seguido de um período de incubação livre de estresse permite que as células tenham a capacidade de responder e sobreviver posteriormente, quando sofrem um estímulo estressante que deveria ser letal.

Além disso, *S. cerevisiae* também é capaz de adquirir a chamada resistência cruzada. Esse fenômeno pode ser exemplificado novamente utilizando o trabalho de Palhano et al. (2004). Em outro experimento, os pesquisadores aplicaram novamente o tratamento de alta pressão hidrostática de 50 MPa por meia hora na levedura, incubaram-na por 15 minutos a 0,1 MPa e depois submeteram-na a uma temperatura que seria normalmente letal. Ao fim do experimento foi visto que o estímulo estressante da alta pressão hidrostática aplicada numa pressão não letal, seguida de um período de incubação sem estresse é capaz de tornar as células resistentes a outros estresses, nesse caso o de choque térmico. Esse resultado fortalece a

afirmação de Hohmann; Mager (2003), de que na resistência cruzada de *S. cerevisiae* os diferentes estresses exigem respostas celulares comuns, por exemplo, ajuste do metabolismo energético e produção de proteínas protetoras, ou pequenas moléculas protetoras.

1.2.1 Alta Pressão Hidrostática como modelo de estresse

Quando se fala em pressão, lembra-se do conceito físico, no qual a mesma é gerada pelo valor de uma força aplicada, dividida por uma determinada área. Todos os corpos, incluindo os organismos vivos, estão sujeitos a algum valor de pressão, seja o da própria camada de ar presente na atmosfera, ou mesmo da coluna d'água e da camada de solo, no caso de organismos aquáticos e os que vivem no subsolo, respectivamente.

É bem conhecido que aproximadamente 70% da superfície terrestre é coberta pelos oceanos, sendo que a profundidade média encontrada nesse ambiente é de 3.800 metros (com a média da pressão hidrostática equivalente a 38 MPa). A Fossa das Marianas, localizada no Oceano Pacífico, apresentam a maior profundidade já localizada no planeta, com mais de 10.000 metros, o equivalente a 100 MPa de pressão hidrostática (MEERSMAN; HEREMANS, 2008). Isso mostra como os organismos vivos estão sujeitos a diferentes condições em seu próprio habitat natural, sendo que essas diferentes condições podem, em alguns casos, ser estressantes para os mesmos.

A utilização de altos valores de pressão tem tido grande emprego biotecnológico e isso se deve à larga utilização desse tratamento pela indústria alimentícia, – com modulação de enzimas e esterilização de seus produtos – além do uso pela indústria farmacêutica, na produção de vacinas antivirais e medicamentos (KAWARAI et al., 2006; AERTSEN et al., 2009; MARX et al., 2011). Além disso, a alta pressão hidrostática (HHP – do inglês *High Hydrostatic Pressure*) vem sendo utilizada em pesquisas científicas como uma ferramenta geradora de estresse em microrganismos. Um dos principais motivos pelos quais se deve esse emprego é o fato de a resposta celular gerada pela alta pressão hidrostática ser muito semelhante à resposta das

células a outros estresses, por exemplo o de temperatura, o alcóólico e o oxidativo, que são os mesmos que as leveduras enfrentam dentro da dorna de fermentação (FERNANDES, 2005), além de ser uma ferramenta de fácil manipulação e controle em laboratório. Dessa forma, a HHP é um excelente instrumento para as pesquisas relacionadas ao estresse na área da biotecnologia, pois permite o entendimento de mecanismos de defesa celulares e a partir disso possibilita o desenvolvimento de novas tecnologias, garantindo o avanço científico aplicado tanto à área do agronegócio, quanto da área da saúde.

Quando um organismo é submetido a altos valores de pressão, ocorre, principalmente, sua compressão e conseqüentemente a diminuição de seu volume celular, gerando a redução da fluidez da membrana plasmática, devido à mudança na disposição dos fosfolipídios, que se tornam mais compactados (FERNANDES, 2008). Além disso, processos como crescimento e divisão celular, viabilidade e indução de alterações em processos fisiológicos e bioquímicos também são afetados (PALHANO et al., 2008).

A exposição a algum estresse, incluindo o gerado pela alta pressão hidrostática, em leveduras gera a ativação de vários genes, dentre eles o *HSP12*, que o torna uma chave fundamental do mecanismo central de resposta ao estresse, sendo que o mesmo tem sido relacionado com a manutenção da flexibilidade da parede celular desses organismos (FERNANDES et al., 2004; MOTSHWENE et al., 2004; KARREMAN et al., 2007; FERNANDES, 2008). A relação da proteína codificada pelo gene *HSP12* e a flexibilidade da parede celular foi vista utilizando microscopia de força atômica pela primeira vez por Karreman et al. (2007), em que os pesquisadores verificaram que a cepa utilizada no estudo, que era geneticamente modificada para não produzir a proteína do gene *HSP12*, possuía uma parede celular menos flexível do que a da cepa selvagem também utilizada.

Apesar de muitos esforços, ainda há um longo caminho a ser percorrido para se conhecer todos os mecanismos envolvidos na resposta dos organismos ao estresse para assim se elucidar como as células se adaptam e conseguem sobreviver em ambientes adversos.

1.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Devido ao seu tamanho com alguns micrômetros de comprimento, a observação a olho nu das células de *S. cerevisiae* é impossível, por isso, faz-se necessário lançar mão de técnicas de microscopia para estudos morfológicos desses organismos.

Um dos microscópios mais difundidos no meio científico e mais conhecidos popularmente, é o microscópio óptico. Nele as imagens são formadas, basicamente, pela incidência de um feixe de luz que atravessa a amostra e alcança as lentes (ocular e objetivas), que são capazes de promover um aumento final da imagem de até 1.000 vezes (DEDAVID et al., 2007). O microscópio óptico é de fácil manipulação, porém ele tem limitações como a de formar imagens em apenas duas dimensões e não proporcionar detalhes da morfologia da parede celular das leveduras, como pode ser observado na figura 2A.

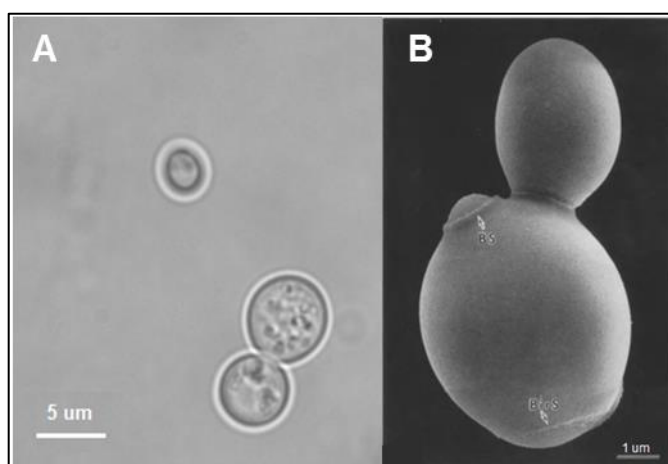


Figura 2: Imagens representativas de *S. cerevisiae*. (A) ao microscópio óptico, aumento de 1000x – próprio autor. (B) ao microscópio eletrônico de varredura – BS: cicatriz de brotamento (do inglês *bud scar*); BirS: cicatriz de nascimento (do inglês *birth scar*) (OSUMI, 1998 – Adaptada)

Outra ferramenta muito utilizada no estudo de microrganismos é o microscópio eletrônico de varredura (MEV). Esses microscópios geram imagens através da emissão de feixes de elétrons em ambiente com vácuo e possuem capacidade de ampliação de até 300.000 vezes, além de proporcionar imagens tridimensionais com riqueza de detalhes. No entanto, os MEVs demandam elaboradas preparações do

material a ser analisado e o próprio feixe de elétrons que faz a leitura das amostras pode causar danos às mesmas (DEDAVID et al., 2007).

Apesar de os microscópios eletrônicos de varredura fornecerem informações valiosas a respeito da morfologia de diversos organismos, esse equipamento não é capaz de fornecer imagens tão detalhadas quando deseja-se analisar mais a fundo microrganismos como *S. cerevisiae*. Pode-se observar na figura 2B que apesar da riqueza de detalhes que o MEV proporciona, não é possível obter informações tão minuciosas sobre a morfologia da parede celular das leveduras, ou mesmo informações sobre rugosidade ou elasticidade dessa parede. Por isso, o uso de outras técnicas se faz necessário, como é o caso da microscopia de força atômica.

1.3.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM - do inglês *Atomic Force Microscopy*) é uma categoria que está incluída no grupo das microscopias de varredura por sonda (SPM – do inglês *Scanning Probe Microscopy*) (HERRMANN et al., 1997). Esses instrumentos, diferentemente dos conhecidos microscópios ópticos ou eletrônicos, não atuam emitindo feixes de luz ou de elétrons, mas possuem um mecanismo capaz de gerar imagens topográficas tridimensionais de forma mecânica à medida que vão “varrendo” toda a superfície da amostra (figura 3). Além disso, os AFMs são capazes de oferecer aumentos de até um milhão de vezes (WEST, 2006).

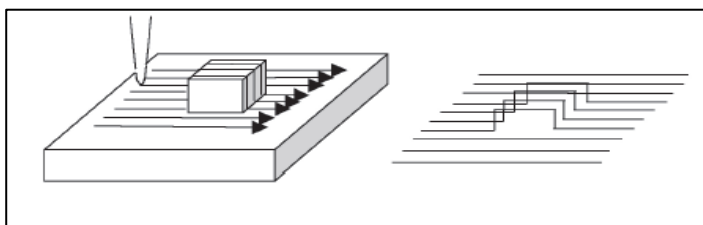


Figura 3: O esquema mostra com as imagens são formadas no AFM. Uma ponta fina varre a superfície da amostra, à esquerda, e o seu movimento a cada passagem pela superfície gera um perfil de linha bidimensional. Em seguida, os perfis de linha são combinados para criar uma imagem tridimensional da superfície, à direita (WEST, 2006)

O AFM possui em sua estrutura um *cantilever* flexível, normalmente composto por silício, com uma ponta de prova com aproximadamente 50 nm de diâmetro (WEST, 2006), que faz a leitura da superfície da amostra analisada nas direções lateral (X-Y) e vertical (Z). Sobre essa ponta incide um *laser* que é refletido em um fotodetector (figura 4). À medida que a ponta percorre a superfície da amostra, ocorrem deflexões do *cantilever* nos eixos X, Y e Z, e consequentemente do *laser*, que será detectado em diferentes regiões do fotodetector. Esses sinais possibilitarão a formação de imagens da topografia das amostras (AGARWAL; NOCERA, 2013).

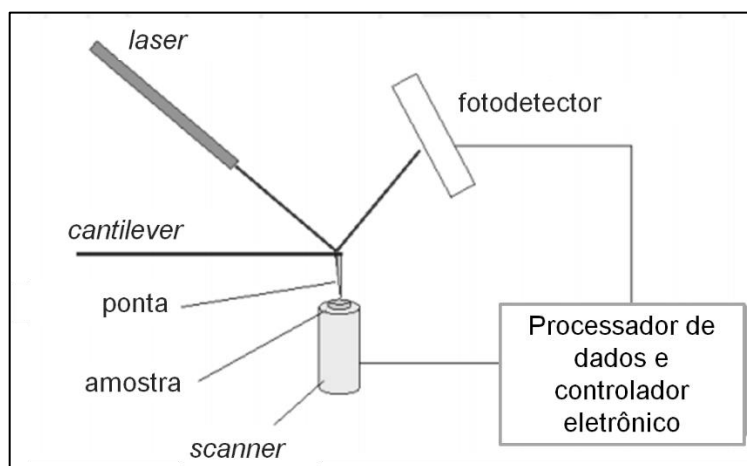


Figura 4: Representação esquemática do funcionamento do AFM (OLIVEIRA et al., 2012 – Traduzida)

Ademais, no AFM a força de interação entre o *cantilever* e a superfície do material analisado é mensurada por um sensor de força. Essa força de interação é recebida pelo sensor e o sinal de saída do mesmo é enviado a um controlador que atua sobre um gerador de movimento, também chamado de *scanner*, tanto no eixo Z, quanto no eixo X-Y (figura 4). O *scanner* é composto de material piezoelétrico, que é capaz de converter um potencial elétrico em movimento mecânico, alterando a posição da ponta em relação à amostra. Todo esse monitoramento dos movimentos é importante para a formação acurada das imagens (WEST, 2006).

O AFM apresenta diversos modos de leitura, um deles é o modo contato, no qual a ponta “desliza” extremamente próxima à superfície do material analisado, ocorrendo uma interação de repulsão do *cantilever* e a amostra (figura 5A). O modo contato gera imagens topográficas de excelente resolução, no entanto pode causar danos à amostra, principalmente no caso de materiais biológicos, devido à grande proximidade

entre *cantilever* e amostra, por isso é indicado para materiais mais resistentes e duros (WEST, 2006; OLIVEIRA et al., 2012; AGARWAL; NOCERA, 2013).

Outro modo de leitura é o não-contato ou dinâmico, no qual o *cantilever* vibra próximo à sua frequência de ressonância à medida que percorre a extensão da amostra, enquanto o controlador do equipamento mantém constante a amplitude do movimento (figura 5B) (DUFRÊNE, 2008). As mudanças que ocorrem no valor da frequência de ressonância são devidas às interações entre ponta e amostra durante a leitura (HERRMANN et al., 1997). No modo de não-contato predominam as forças atrativas entre a ponta e a amostra durante a leitura (WEST, 2006; DUFRÊNE, 2008).

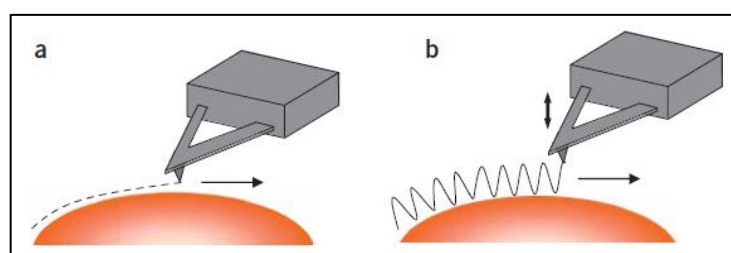


Figura 5: Esquema do comportamento do cantilever durante as leituras no AFM. (a) No modo contato a ponta “desliza” sobre a amostra. (b) No modo não-contato a ponta vibra sobre a amostra (DUFRÊNE, 2008 – Adaptada)

Existe ainda o modo de contato intermitente ou *tapping*, que possui um funcionamento semelhante ao do modo não-contato. A diferença é que no modo de contato intermitente o *cantilever* vibra mais próximo da superfície da amostra, tocando-a periodicamente. Nesse modo de leitura atuam tanto as forças atrativas quanto as repulsivas (FERREIRA; YAMANAKA, 2006; WEST, 2006). Esse modo de leitura fornece imagens de alta qualidade quando o material a ser analisado é delicado, como é o caso de materiais biológicos, e também quando as imagens são feitas em ambiente aberto em contato direto com o ar, enquanto que as leituras no modo contato para esse tipo de material são indicadas para serem feitas em meio líquido (HERRMANN et al., 1997; WEST, 2006; OLIVEIRA et al., 2012; AGARWAL; NOCERA, 2013). Uma grande vantagem desse modo de leitura em relação ao modo não contato é que ele possibilita leitura de áreas maiores e com maior variação de altura na superfície da amostra (HERRMANN et al., 1997).

Por fim, uma ferramenta utilizada no modo de contato intermitente é o modo fase, que oferece dados sobre diferenças nas propriedades da superfície da amostra. Como já

foi mencionado anteriormente, quando a leitura é feita com vibração do *cantilever*, o controlador do equipamento mantém sua fase relativa ou a amplitude constantes. Dessa forma, por exemplo, se durante a leitura a ponta tocar uma área mais elástica com a amplitude de vibração constante, haverá variações na interação entre ponta e amostra e consequentemente, haverá uma mudança de fase (figura 6). Apesar de o modo fase fornecer imagens com excelente contraste, seus dados são qualitativos, sendo muito difícil obter dados quantitativos (MCLEAN; SAUER, 1997; WEST, 2006; OLIVEIRA et al. 2012).

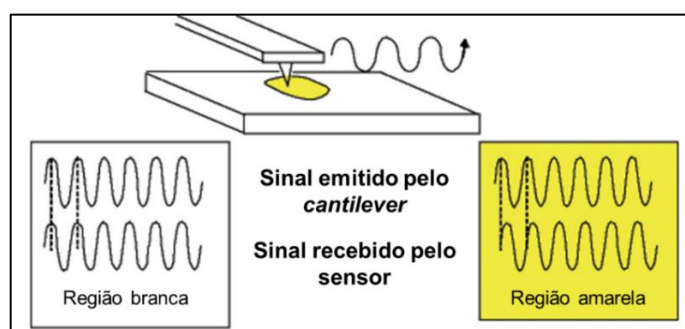


Figura 6: Funcionamento do modo fase. Quando o cantilever passa sobre a região amarela a mudança de fase entre o sinal emitido pelo cantilever e o sinal recebido pelo sensor do AFM muda, ocorrendo um *delay* entre esses sinais (WEST, 2006 - traduzida)

Após realizadas as imagens, é possível obter dados sobre diversos itens, como rugosidade, por exemplo. A rugosidade de um material pode ser obtida através de diversos parâmetros, como a rugosidade aritmética (R_a) que é uma “média aritmética dos valores absolutos do perfil de altura da superfície” (OLIVEIRA et al., 2012), ou seja, é uma média das alturas de picos e vales, da amostra. Esse é o parâmetro mais utilizado mundialmente como indicador de rugosidade superficial, por ser simples e por abranger de maneira geral a da rugosidade da amostra (PARRA et al., 2006, RAPOSO, et al., 2007). Porém, esse parâmetro é pouco sensível a alterações pontuais que possam ocorrer ao longo da região analisada. Por essa razão, é possível que diferentes perfis de rugosidade possam ter um mesmo valor de R_a (PARRA, et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012).

A rugosidade média quadrática (R_q), utiliza a raiz quadrada da média dos valores mensurados ao quadrado e por isso é mais sensível a desvios que ocorram na superfície analisada do que o R_a . (OLIVEIRA et al., 2012; MARCHIORI, 2013). Além

disso, boas medições apresentam valores de Ra e Rq que são concordantes (RAPOSO, 2007).

Por fim, o parâmetro Rz, chamado por alguns autores de média de dez pontos, oferece a média dos cinco picos com maior amplitude somada à média dos cinco vales com maior amplitude e é, de forma simplificada, um valor que representa a média da altura máxima total do relevo da amostra (PARRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012). Devido à forma como são calculados, os valores de Rz são mais altos do que os valores de Ra e Rq. Além disso, o Rz é um parâmetro sensível a variações da superfície, sendo complementar ao Ra (OLIVEIRA et al., 2012; MARCHIORI, 2013). O quadro 1 apresenta de forma esquemática as características principais dos parâmetros de rugosidade obtidos a partir das leituras por AFM.

Quadro 1: Resumo das características dos parâmetros de rugosidade obtidos por AFM.

Ra	Rz	Rq
<ul style="list-style-type: none"> • Rugosidade aritmética; • Média aritméticas das alturas de picos e vales, da amostra; • Proporciona uma visão geral da superfície; • Pouco sensível a alterações pontuais. 	<ul style="list-style-type: none"> • Média de dez pontos; • Média dos cinco picos com maior amplitude somada à média dos cinco vales com maior amplitude; • Representa a média da altura máxima analisada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rugosidade quadrática média; • Utiliza a raiz da soma dos quadrados dos valores mensurados; • Mais sensível a desvios que ocorram na superfície analisada do que o Ra.

Fatores como a alta resolução das imagens, a grande facilidade e rapidez no preparo de amostras são grandes atrativos do uso da microscopia de força atômica de forma geral, sendo um equipamento extremamente versátil, que pode ser aplicado em vários campos da ciência (HERRMANN et al, 1997). Nas pesquisas da área biológica e biotecnológica, a microscopia de força atômica tem ganhado cada vez mais espaço, em especial nos estudos com microrganismos, abrindo novos caminhos, por possibilitar até a análise de células e microrganismos vivos, quase que em tempo real, oferecendo imagens com aumento antes sequer imaginado (FERREIRA; YAMANAKA, 2006; DUFRÊNE, 2010; DOKTYCZ et al., 2011).

Assim, a aplicação dessa técnica de microscopia nos estudos para compreensão dos efeitos do estresse nos organismos vivos, em especial em leveduras de diferentes idades, traz novas possibilidades ao campo da biotecnologia, podendo trazer conhecimentos científicos que sejam aplicáveis comercialmente, beneficiando a ciência e a sociedade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a topografia tridimensional de células de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes estágios de vida e após estresse causado pela alta pressão hidrostática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar um protocolo de análise em AFM para células-mães e filhas de *S. cerevisiae*;
- Comparar as características morfológicas da parede celular de células-mães e filhas de *S. cerevisiae* através de AFM;
- Comparar as características morfológicas da parede celular de *S. cerevisiae* após estresse de alta pressão hidrostática através de AFM;
- Analisar e comparar a rugosidade da parede celular de *S. cerevisiae* tratada com alta pressão hidrostática;
- Projetar representações gráficas tridimensionais da rugosidade da parede de células-mães e filhas de *S. cerevisiae*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORGANISMOS UTILIZADOS E CRESCIMENTO CELULAR

Para este trabalho foi utilizada a cepa laboratorial de *S. cerevisiae* UCC5181 (haploide), cedida pelos pesquisadores Derek L. Lindstrom e Daniel E. Gottschling, da Divisão de Ciências Básicas do Centro de Pesquisa do Câncer Fred Hutchinson, Seattle, Washington no ano de 2015, estando estocadas a -80 °C no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da UFES. A UCC5181 foi geneticamente modificada a partir da cepa de referência S288C (laboratorial) e sua modificação faz com que, quando em presença de estradiol, as células-filhas não sejam capazes de se reproduzir, enquanto que as células-mães não têm qualquer tipo de impedimento replicativo.

Uma alíquota do estoque foi retirada para realização de plaqueamento de armazenamento em meio YEPD sólido (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose e 2% ágar), ficando 48 horas incubada a 28 °C. Após esse período as placas ficaram armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

Para a realização de cada experimento foi feito um pré-inóculo, no qual uma colônia da placa de armazenamento era retirada e crescida em meio de cultura YEPD líquido (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose), a 28 °C e agitação de 160 rpm, por aproximadamente 16 horas. Após esse período era feito um novo inóculo, em que uma alíquota do pré-inóculo era transferida para um novo YEPD líquido. O volume do pré-inóculo transferido é equivalente a 1% do volume final do novo inóculo, ou seja, 5 µL do pré-inóculo para 5 mL de meio de cultura. Esse novo inóculo foi mantido a 28 °C e agitação de 160 rpm, por aproximadamente 2 horas, quando as células atingiam a fase logarítmica de crescimento, com densidade óptica (D.O._{600nm}) de aproximadamente 0,7.

Após esse processo de crescimento, foram traçadas duas estratégias diferentes para obtenção das diferentes populações de células. Enquanto que para obtenção de células-filhas as leveduras passaram por um processo de separação (seção 3.2), a

população total, utilizada para análise de células-mães, foi prontamente encaminhada para aplicação da alta pressão hidrostática. Para a leitura em AFM as células-mães da população total foram distinguidas pela presença das cicatrizes da parede celular. Resumidamente, foram estudados quatro grupos experimentais neste trabalho: células-mães sem HHP, células-mães após HHP, células-filhas sem HHP e por fim células-filhas com HHP.

3.2 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS-MÃE E FILHAS

As cepas que foram incubadas nas condições já descritas, crescendo até a $D.O_{600nm} \sim 0,7$ foram centrifugadas e lavadas com tampão fosfato-salino (PBS), para serem marcadas com biotina (*Sigma-Aldrich*, SP, Brasil) (3 mM), permanecendo por um período de 45 minutos a 25 °C e agitação de 8 rpm, na ausência de luz. Após esse período elas foram lavadas com o tampão PBS e glicina (100 μ M) e inseridas num novo meio de cultura, agora contendo β -estradiol (*Sigma-Aldrich*, SP, Brasil) na concentração de 1 μ M. As leveduras marcadas permaneceram nesse meio de cultura a 28 °C e agitação de 160 rpm por 2h (alcançando $D.O_{600nm}$ entre 1,2 e 1,5). As células-filhas geradas durante esse período não possuíam a marcação com a biotina, como as células-mães que lhes deram origem, estando temporariamente estéreis, pelo fato de estarem em um meio contendo estradiol. As células foram centrifugadas a 4 °C e lavadas novamente com PBS gelado. Foram adicionados 5 μ L de estreptavidina ligada a microesferas magnéticas (*Promega*, Madison, Estados Unidos), que tem como função ligar-se à biotina aderida à superfície das células-mães marcadas previamente.

Foi feita nova lavagem das células com PBS e o tubo no qual elas estavam foi submetido a forte campo magnético. Dessa forma as células-mães que estavam marcadas ficavam aderidas à parede do mesmo, enquanto as células-filhas eram delicadamente aspiradas com a ajuda de uma micropipeta de 10 μ L.

3.3 TRATAMENTO COM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Após a realização das etapas anteriores, as amostras obtidas foram submetidas ao tratamento por alta pressão hidrostática, sendo aplicados 100 MPa por 30 min cada. Alíquotas não-pressurizadas foram utilizadas como controle.

Para realização do processo as células foram colocadas em um tubo de teflon de 4 mL, hermeticamente fechado, à temperatura ambiente e inserido em pistão de aço. Esse sistema foi então colocado em prensa hidráulica (*Eureka*, MG, Brasil) e a pressão aplicada foi mensurada através de um manômetro mecânico calibrado (*Woler Brasileira*, MG, Brasil).

Após os 30 min de aplicação do estresse gerado pelo tratamento por alta pressão hidrostática, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 4 °C e lavadas com água ultrapura gelada, para que não houvesse interferência dos íons presentes na água destilada nas análises em AFM, sendo levadas imediatamente para análise em microscopia de força atômica.

3.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Para as análises no microscópio de força atômica foram adicionadas gotas de 1,5 µL das amostras em água ultrapura sobre fita dupla-face colada em porta-amostra de metal. As amostras permaneceram a 25 °C até que toda a água presente da amostra evaporasse. Esse processo garante que as células estejam bem aderidas ao substrato no qual foram aplicadas, permitindo a correta leitura pelo microscópio de força atômica. Depois que toda água tivesse evaporado, era feita, através do microscópio de força atômica, buscas randômicas por células, buscando preferencialmente leveduras isoladas.

Foi utilizado para este trabalho o microscópio de força atômica SPM-9600 Series (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japão). As imagens foram feitas em modo de leitura de contato intermitente e modo fase, utilizando *cantilever* de silício sem cobertura

metálica, PPP-NCH-20 (*Nanosensors*, Neuchâtel, Suíça), com constante de mola 4,8 N/m e frequência de ressonância 354 kHz.

As imagens foram feitas com 512x512 pixels, com tamanhos entre 30 e 20 μm , obtendo-se imagens de topografia (altura e tridimensional) e também de fase. A frequência de leitura foi feita segundo as recomendações do fabricante. Posteriormente foi utilizado o *software* SPM Offline Version 3.31 (*Shimadzu Corporation*, Kyoto, Japão) para obtenção de dados de rugosidade das amostras. Para a realização dessa etapa as imagens foram catalogadas de acordo com o dia de realização do experimento e as células foram individualmente identificadas de acordo com o seu comprimento em micrômetros (figura 7), em um universo de 11 células em cada grupo experimental.

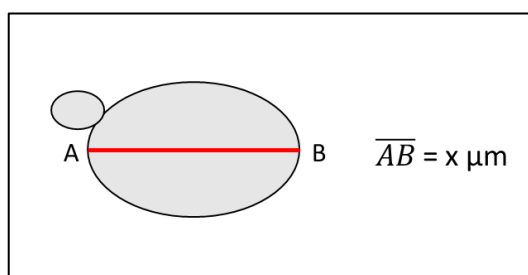


Figura 7: Identificação das células através do seu comprimento. Quando a linha de análise (\overline{AB}) é delimitada, o comprimento da levedura pode ser determinado

Após a identificação, foi feita a coleta de dados de rugosidade. Sobre a superfície de cada levedura foram traçadas 10 linhas de análise de 3,75 μm de comprimento (menor comprimento permitido pelo *software*). Com essa ferramenta é possível computar os dados de rugosidade ao longo da linha traçada, obtendo-se então os parâmetros R_a , R_z e R_q . Os resultados foram organizados em tabelas, de modo a permitir a comparação dos valores obtidos e a partir deles realizar cálculo de variação da rugosidade (em porcentagem) entre o maior e menor valores encontrados. Esse procedimento foi feito para R_a , R_z e R_q e foi feito Teste t de Student a partir das médias de variação de rugosidade. Foram plotados gráficos de caixa (*boxplots*) ilustrando essa variação, através do *software* Minitab 18 (*Minitab Inc.*).

3.5 TESTE DE CALIBRAÇÃO DO AFM

Para garantia de que o equipamento estava devidamente calibrado, foram realizadas leituras de lamínulas de vidro para microscopia (*Glasscyto*). A partir de imagem da lamínula limpa foram traçadas 10 linhas de análise de $3,75\ \mu\text{m}$ de comprimento, tendo sido feitas duas repetições. Com os dados organizados em tabela também foi calculada a porcentagem de variação entre o maior e menor valores encontrados para R_a , R_z e R_q . A escolha pelas lamínulas de vidro foi devida ao fato desse material ser extremamente polido, e por isso pouco rugoso, uma vez que são utilizadas em microscopia óptica e devem permitir pouquíssima difração da luz.

A figura 8 mostra de forma esquemática as etapas metodológicas realizadas ao longo deste trabalho.

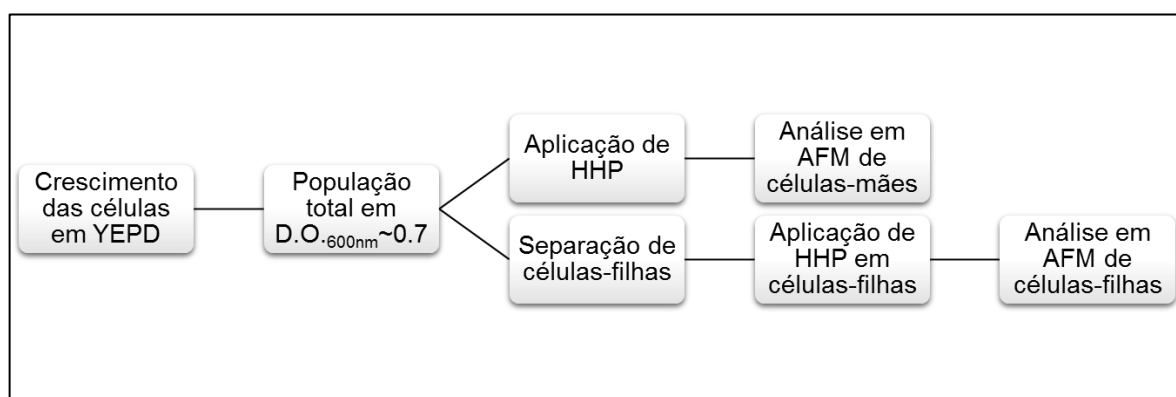


Figura 8: Fluxograma das etapas metodológicas realizadas

3.6 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LEVEDURA

Para a realização desta etapa do trabalho utilizaram-se as mesmas medidas de rugosidade fornecidas pelo AFM, ou seja, para cada levedura, consideraram-se os valores das dez linhas de análise (L1-10) e com eles foi feito o cálculo de uma média individual de R_a , R_z e R_q (MI). Posteriormente foi calculada uma média total (MT) para cada população a partir das médias individuais (Tabela 1).

Esses dados foram utilizados para a montagem de uma representação gráfica tridimensional para cada um dos grupos experimentais: células-mães à pressão ambiente e após tratamento por HHP de 100 MPa e as células-filhas à pressão ambiente e após aplicação de 100 MPa de pressão. Essa representação mantém a proporção entre o tamanho médio das leveduras e seus valores de rugosidade.

Tabela 1: Organização dos dados e cálculo de médias para Ra, Rz e Rq

Célula	Rugosidade (nm)										Média individual (nm)
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	
1	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉	V ₁₀	MI _V
2	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	MI _X
3	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀	MI _Y
n	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	Z ₅	Z ₆	Z ₇	Z ₈	Z ₉	Z ₁₀	MI _Z
MT											

L1-10: Valores de linha de análise (1-10);

V₍₁₋₁₀₎, X₍₁₋₁₀₎, Y₍₁₋₁₀₎ e Z₍₁₋₁₀₎: Valores de rugosidade obtidos em cada uma das linhas de análise;

MI_V, MI_X, MI_Y e MI_Z: Média individual de cada célula;

MT: Média total do grupo experimental;

n: Universo de 11 células por grupo experimental.

Para isso, foi desenvolvido um programa, utilizando o *software* MATLAB (*MathWorks*, EUA), em que se partiu de um sólido elipsoide com comprimento maior e menor definidos com base nas médias dessas dimensões das populações analisadas. Na superfície desse sólido foram inseridos ruídos aleatórios para simular as rugosidades da superfície das células. Esses ruídos foram gerados com condições para satisfazer os parâmetros de Ra, Rz e Rq representativos para cada população. As imagens geradas mantêm a proporção da ordem de grandeza entre os comprimentos da levedura e os valores médios de rugosidade, sendo possível, modificando o código de programação, alterar as dimensões da célula. Além disso, o *software* também permite gerar imagens em rotação (em formato gif), que mostra toda a superfície da célula.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTE DE CALIBRAÇÃO COM LAMÍNULA DE VIDRO

Para testar a calibração do equipamento e garantir a fidedignidade das imagens, foram feitos testes em lamínula de vidro e as variações dos valores de Ra, Rz e Rq são apresentadas na tabela 2. Os dados brutos são apresentados no apêndice A.

Tabela 2: Variação relativa de rugosidade em lamínula de vidro

Medições	Variação de Ra (%)	Variação de Rz (%)	Variação de Rq (%)
1	2,34	4,49	3,09
2	1,46	1,77	1,25
3	2,07	6,70	0,70

É possível observar que a variação da rugosidade na lamínula de vidro foi pequena, o que já era esperado, visto que lamínulas de vidro possuem pouca rugosidade, fortalecendo a credibilidade dos dados que o AFM é capaz de fornecer e consequentemente mostrando a confiabilidade dos dados que foram obtidos neste trabalho.

4.2 EFEITOS DA HHP NA PAREDE CELULAR DE CÉLULAS-MÃES E FILHAS

Para a obtenção desses resultados foram utilizadas as células-mães de alíquotas com a população total e também células-filhas após o processo de separação. A escolha da utilização da população total foi devida ao fato de as células-mães receberem marcação com biotina, estreptavidina e microesferas magnéticas durante o processo de separação. Como a ligação da biotina, se dá na porção –N terminal de proteínas da parede celular das leveduras de forma estável, por ligação covalente, não seria viável utilizar essas células marcadas no AFM e obter resultados fiéis, uma vez que

esse equipamento é capaz de interagir com as forças interatômicas das amostras analisadas.

Também é importante destacar que durante as leituras no microscópio de força atômica dessas alíquotas de população total, foram consideradas como células-mães aquelas leveduras nas quais era possível perceber nitidamente a presença de cicatrizes dos brotos. As que não possuíam visivelmente essa estrutura eram desconsideradas da análise (figura 9). Esse descarte foi devido à incerteza de se aquelas células que não possuíam marcas aparentes eram células-filhas, ou se eram células-mães cujas cicatrizes estavam em contato com o porta-amostra, ou seja, fora do alcance de leitura do AFM.

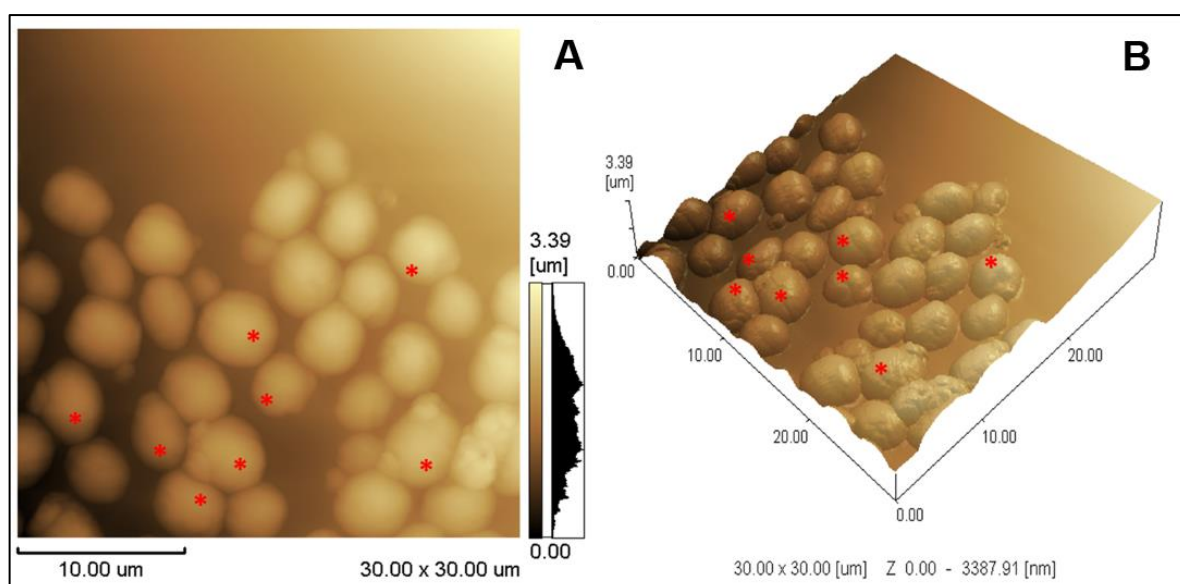


Figura 9: Imagem obtida em AFM de população total de *S. cerevisiae*. (A) imagem de altura. (B) representação tridimensional da imagem (A). Os asteriscos vermelhos indicam células com presença de cicatrizes visíveis e que tiveram seus dados registrados. As demais foram descartadas

Outro ponto a ser destacado é que inicialmente as amostras estavam sendo acomodadas sobre discos de mica muscovita aderidas ao porta-amostra para leitura no AFM. Esse procedimento é recomendado na literatura devido aos poros do próprio mineral que manteriam as células “presas” durante a análise (DUFRENE, 2008; MÜLLER; DUFRENE, 2011). No entanto, não houve sucesso nesse procedimento, uma vez que ocorriam diversos erros de leitura, impossibilitando a formação de imagens para análise posterior. Contudo, não se sabe quais os motivos pelos quais esse problema pode ter ocorrido. Devido a isso, optou-se por voltar ao procedimento adotado anteriormente no laboratório, que era o uso de fita adesiva dupla-face, que

mantém as células bem aderidas durante as leituras e permite a obtenção de boas imagens.

Neste trabalho também foi proposta a utilização de imagens de modo fase, que por não terem tido resultados satisfatórios, não foram utilizadas. No entanto, a nível de ajuste de protocolo, maiores detalhes são apresentados no apêndice B.

Na figura 10 são mostradas imagens topográficas de altura e suas respectivas imagens tridimensionais, de células-mães e células-filhas antes e após a aplicação de alta pressão hidrostática. Visivelmente não é possível perceber diferenças na morfologia das paredes das leveduras nas diferentes populações. No entanto, já é conhecido que paredes celulares de fungos, de modo geral, apresentam composição química diferente em diversas condições, inclusive dependendo da idade da cultura (ORLEAN, 1997; RUIZ-HERRERA, 2012). Por isso também foram utilizados parâmetros de rugosidade para investigar se ainda existe diferença entre cada um dos grupos pesquisados.

Para obtenção dos dados de rugosidade foram desconsideradas as regiões de cicatrizes das células-mães, por elas serem regiões bem mais resistentes do que o restante da parede celular, devido à grande quantidade de quitina que apresentam (TOUHAMI et al., 2003; DAGUE et al., 2010).

Os dados de rugosidade obtidos indicaram que, nos quatro grupos experimentais os valores de rugosidade foram muito variáveis, tanto em uma mesma célula, quanto entre as demais de cada um desses grupos, tornando inviáveis as comparações entre os grupos e entre os seus indivíduos. Para solucionar esse problema, foi calculada a variação relativa dos parâmetros R_a , R_q e R_z de cada célula analisada (APÊNDICE C) e essa variação foi comparada através de gráficos *boxplot* para cada grupo experimental.

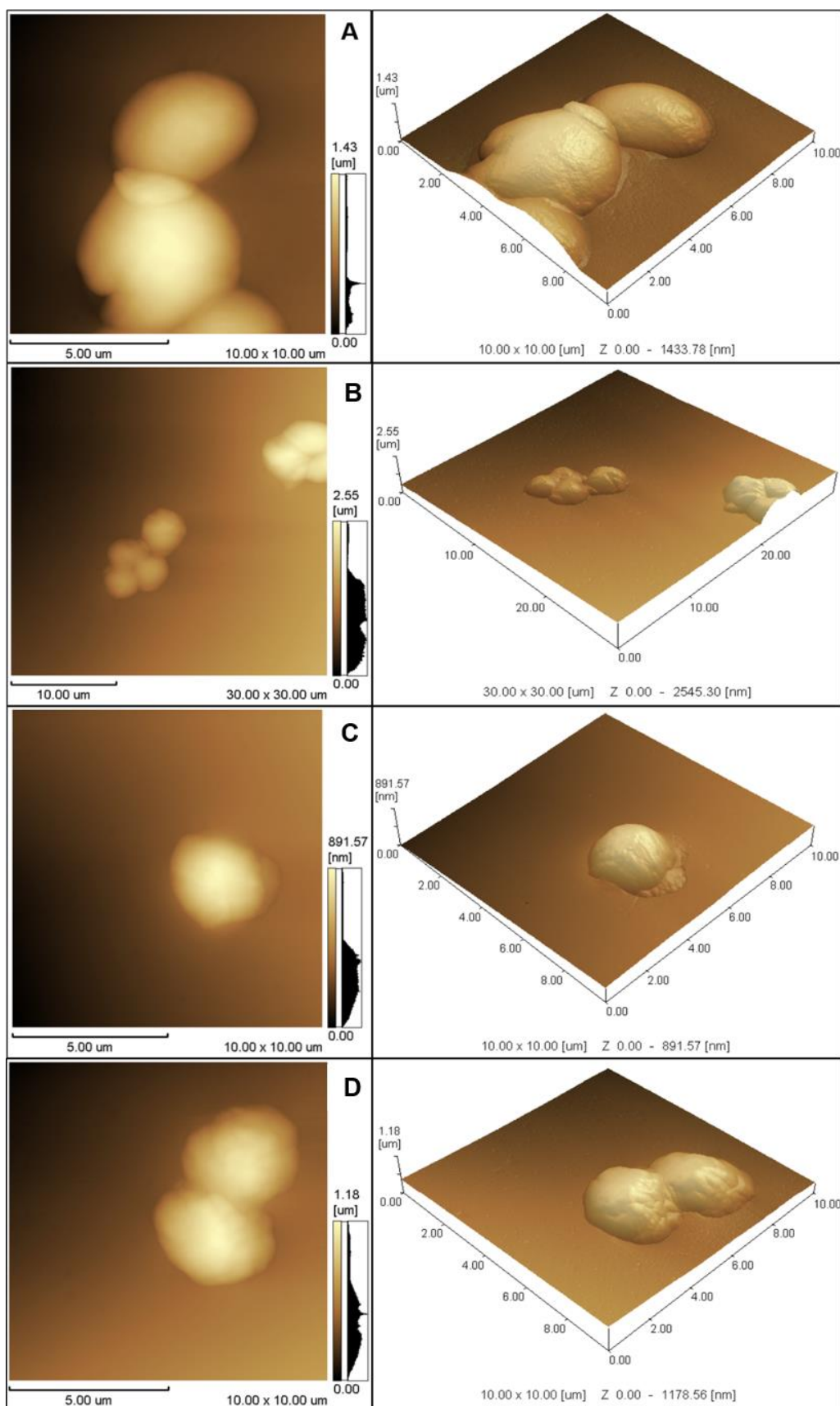


Figura 10: Diferentes populações de *S. cerevisiae* analisadas. À esquerda: imagens de topografia e à direita: imagens tridimensionais da imagem apresentada à direita. (A) Células-mães a 0,1 MPa; (B) Células-mães após 100 MPa; (C) Células-filhas a 0,1 MPa; (D) Células-filhas após 100 MPa

A figura 11 mostra o gráfico que compara essas variações de rugosidade em células-mães e filhas à pressão ambiente. Nele é possível observar que a distribuição dos valores de variação da rugosidade, em porcentagem, tanto em células-mães quanto em filhas, é bem dispersa, havendo apenas uma ocorrência de dado discrepante dos demais (*outlier*). Apesar de dispersos, ocorre um agrupamento dos dados nas caixas que mostram que as células-filhas apresentam variação da rugosidade numa faixa mais elevada (entre aproximadamente 29-51%) do que as células-mães (entre aproximadamente 18-40%). Dessa forma, as células-filhas a 0,1 MPa (pressão ambiente) apresentam menor uniformidade no relevo de sua superfície quando comparadas às células-mães.

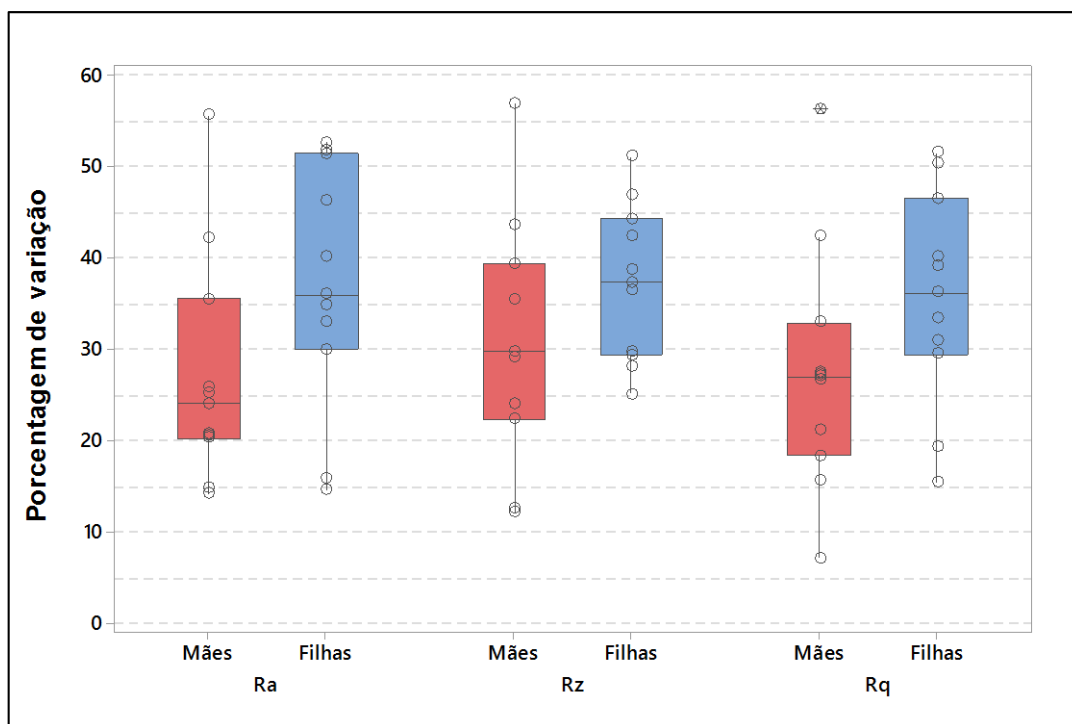


Figura 11: Comparação da variação de rugosidade de células-mães e filhas de *S. cerevisiae* a 0,1 MPa. Os círculos indicam os valores encontrados e o asterisco (*) indica um *outlier*. Valores de *p-value* para Ra < 0,01; para Rz = 0,20; para Rq = 0,13

A figura 12 compara a variação relativa da rugosidade entre células-mães à pressão ambiente e após a aplicação do estresse de alta pressão hidrostática de 100 MPa. É possível observar que, basicamente, a maioria dos valores de variação de rugosidade está numa mesma faixa, entre aproximadamente 15-40%. Além disso, os valores das células-mães após 100 MPa de pressão hidrostática se mostraram mais agrupados

do que nas células a 0,1 MPa, indicando uma maior uniformidade do perfil de rugosidade em células-mães após a aplicação de HHP.

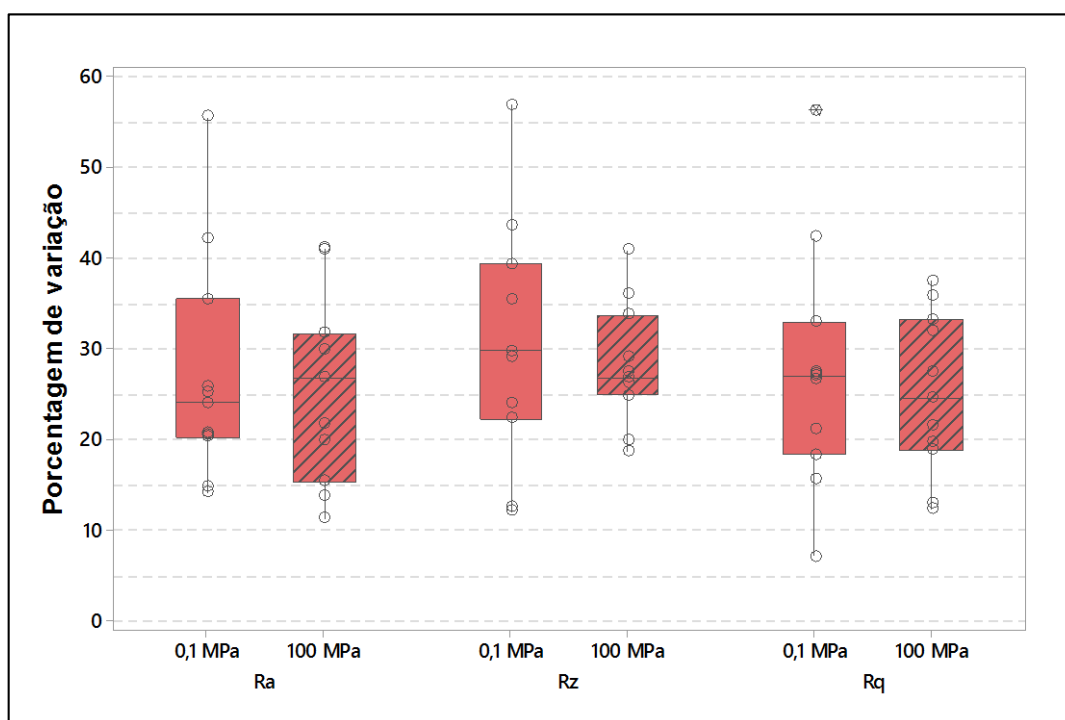


Figura 12: Comparação da variação de rugosidade de células-mães de *S. cerevisiae* antes e após o tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min. Os círculos indicam os valores encontrados e o asterisco (*) indica um *outlier*. Valores de *p-value* para Ra < 0,01; para Rz = 0,52; para Rq = 0,64

A manutenção de variação numa mesma faixa pode indicar que as células-mães quando são submetidas ao estresse de alta pressão hidrostática são capazes de manter a estrutura da sua parede celular. Essa suposição é convergente com os resultados encontrados por Amorim (2016), que analisou a expressão dos principais genes envolvidos na resposta ao estresse, longevidade e envelhecimento de *S. cerevisiae* em populações de células-mães e filhas e observou que as células-mães eram capazes de responder ao estresse de alta pressão hidrostática, mantendo constante a expressão dos genes investigados. Assim, a manutenção da integridade da parede celular das células-mães antes e após o estresse pode ser vista como uma forma de “adaptação” às condições adversas que a alta pressão hidrostática representa, mantendo a sua viabilidade.

Ao comparar ainda a variação da rugosidade, nas células-filhas a 0,1 MPa e após aplicação do tratamento de HHP de 100 MPa por 30 min (figura 13), percebe-se que para ambos os grupos a maioria das células apresenta mais de 20% de variação. Nas

células-filhas que sofreram o estresse gerado pelo tratamento de alta pressão hidrostática os valores de variação também estavam mais agrupados do que os das células controle, à pressão ambiente, mostrando haver maior uniformidade do perfil de rugosidade em sua parede celular.

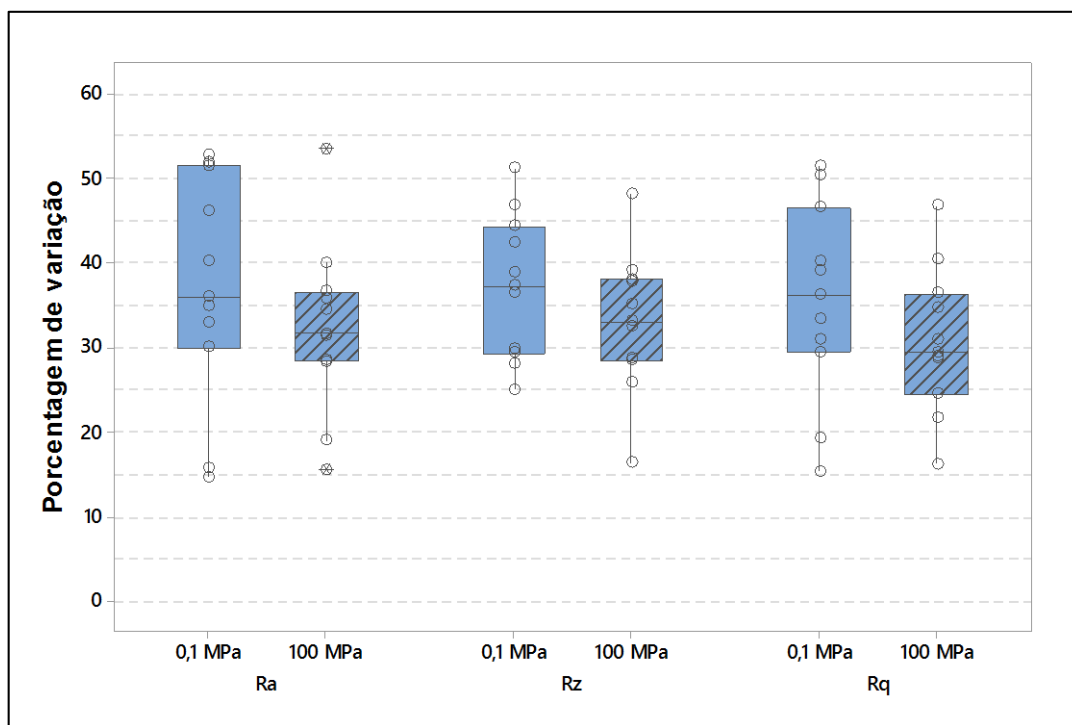


Figura 13: Comparação de variação da rugosidade de células-filhas de *S. cerevisiae* antes e após o tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min. Os círculos indicam os valores encontrados e os asteriscos (*) indicam a ocorrência de *outliers*. Valores de *p-value* para Ra < 0,36; para Rz = 0,25; para Rq = 0,27

Assim, confrontando os três gráficos, sugere-se que o maior agrupamento de dados observadas nos mesmos, e conseqüentemente a maior uniformidade da superfície das células, tanto em células-mães quanto em filhas após a aplicação do tratamento de 100 MPa de alta pressão hidrostática pode ser devido à compressão das células durante o processo de pressurização, uma vez que a alta pressão hidrostática tende a comprimir os corpos que estão sujeitos a ela (FERNANDES, 2005).

A figura 14 mostra a mesma variação de rugosidade, também em porcentagem, porém comparando células-mães e filhas após aplicação do tratamento de 100 MPa de pressão hidrostática, permitindo visualizar comparativamente essas duas populações. Pelo gráfico é possível destacar que as células-filhas que receberam o tratamento tiveram menor dispersão dos dados de porcentagem de variação do que as células-mães submetidas às mesmas condições. Esses dados poderiam indicar que as

células-filhas são mais sujeitas aos efeitos da alta pressão hidrostática, como foi mostrado por Amorim (2016), em que células-filhas após o estresse de HHP tinham menor taxa de sobrevivência do que as células-mães também estressadas.

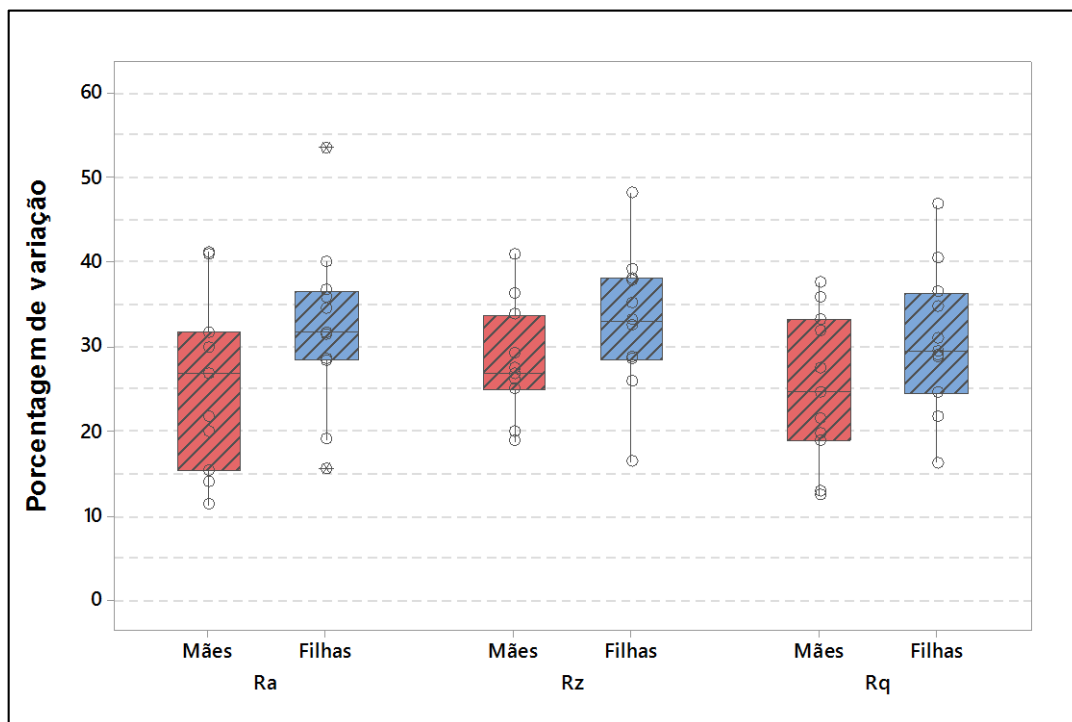


Figura 14: Comparação de variação de rugosidade de células-mães e filhas *S. cerevisiae* após tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min. Os círculos indicam os valores encontrados e os asteriscos (*) os outliers. Valores de *p-value* para Ra = 0,12; para Rz = 0,14; para Rq < 0,01

Bravim (2011) mostrou que o estresse de alta pressão hidrostática é capaz de aumentar a expressão de alguns genes que estão relacionados a uma via de integridade da parede celular, que basicamente tem a finalidade de reorganizar a parede da célula e impedir a sua lise, sendo que uma das ações de atuação dessa via é a mudança na proporção dos polissacarídeos presentes na parede celular, principalmente da quitina, fazendo com que haja um aumento de até 10-20% da massa da parede (DAGUE et al., 2010). Sabe-se ainda que, em células-mães, existe uma deposição de quitina em forma de anel na região da cicatriz dos brotos e ainda nas laterais da sua parede celular, sendo considerada importante na manutenção da resistência da célula (DAGUE et al., 2010). No entanto, as células-filhas não possuem esse polissacarídeo (DE NOBEL et al., 1990) e por isso Klis et al. (2006) argumentam que a quitina não é essencial para a resistência mecânica das paredes laterais de leveduras. Segundo Dague et al. (2010) o que garante a resistência da parede celular

não é simplesmente a presença da quitina, mas as ligações cruzadas que são formadas entre essa quitina e o β -1,3-glicano. Dessa forma, é possível sugerir que a maior sensibilidade das células-filhas pode ser devida à estrutura molecular da sua parede celular, que é diferente à das células-mães.

4.3 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS LEVEDURAS

Por fim, como foi possível observar pelos dados obtidos neste trabalho, a superfície das leveduras não é homogênea e por isso elas não apresentam uma rugosidade uniforme. Porém, para a realização dessa etapa do trabalho considerou-se a condição ideal, de que esses microrganismos possuem uma superfície com valor de rugosidade constante e por isso foram utilizados os valores das médias totais (conforme explanado na seção 3.5). Portanto, tratam-se de representações gráficas baseadas nos dados encontrados experimentalmente, mas não fieis à realidade encontrada na natureza.

Além disso, o principal atrativo desse programa (APÊNDICE D) é a possibilidade de observação das representações em escala, mantendo-se a proporção entre o tamanho médio das leveduras e da rugosidade média encontrada. Essa opção permite fornecer imagens que deem melhor noção da superfície da parede celular, uma vez que são mostradas medidas macroscópicas, que são mais familiares e também sendo possível fazer comparações com objetos do cotidiano, por exemplo. Além disso, é possível montar imagens tridimensionais de cada um dos grupos estudados neste trabalho em rotação, no formato 'gif'.

Como o relevo dessas imagens foi gerado através de ruídos aleatórios, alguns dos parâmetros de rugosidade podem não apresentar os valores exatos obtidos através das médias calculadas, porém os mesmos são bem aproximados.

As figuras seguintes foram todas feitas com um aumento de dez mil vezes com relação aos valores de média de maior e menor comprimento. A figura 15 mostra uma célula-mãe à pressão ambiente em representação gráfica, com os valores, em escala, dos parâmetros de rugosidade e dos comprimentos da célula.

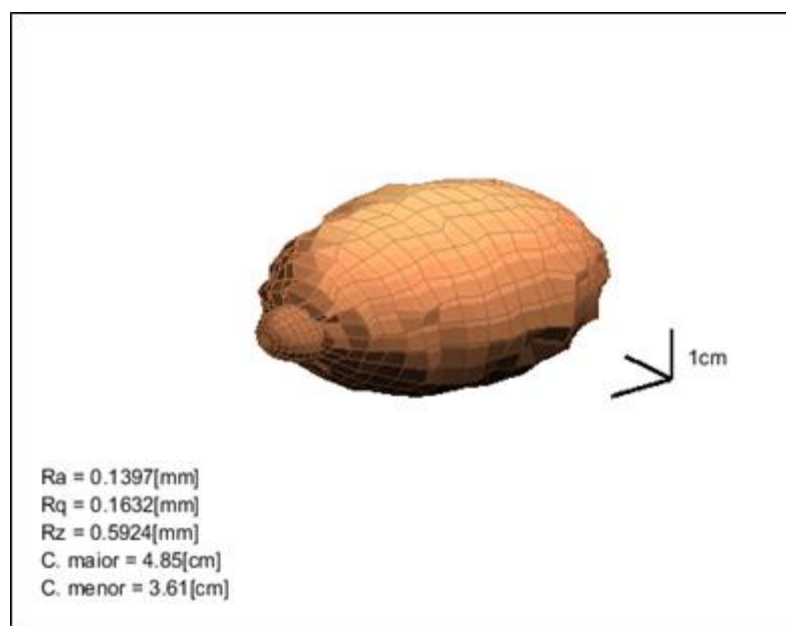


Figura 15: Representação gráfica de célula-mãe de *S. cerevisiae* à pressão ambiente. Aumento de dez mil vezes. C. maior: comprimento maior. C. menor: comprimento menor

A figura 16 apresenta o esquema de uma célula-mãe após a aplicação do tratamento por alta pressão hidrostática de 100 MPa por 30 minutos.

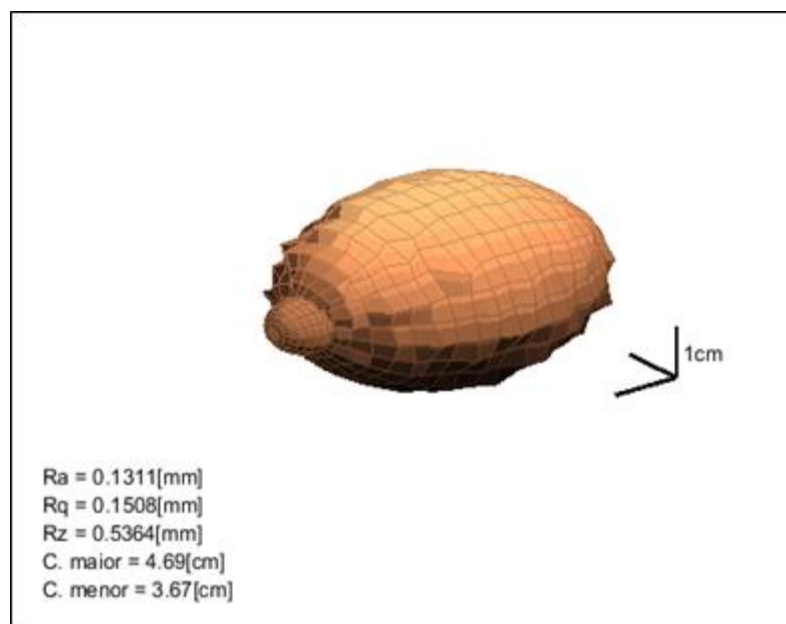


Figura 16: Representação gráfica de célula-mãe de *S. cerevisiae* após tratamento por alta pressão hidrostática de 100 MPa por 30 minutos. Aumento de dez mil vezes. C. maior: comprimento maior. C. menor: comprimento menor

A próxima imagem (figura 17) representa uma célula-filha à pressão ambiente.

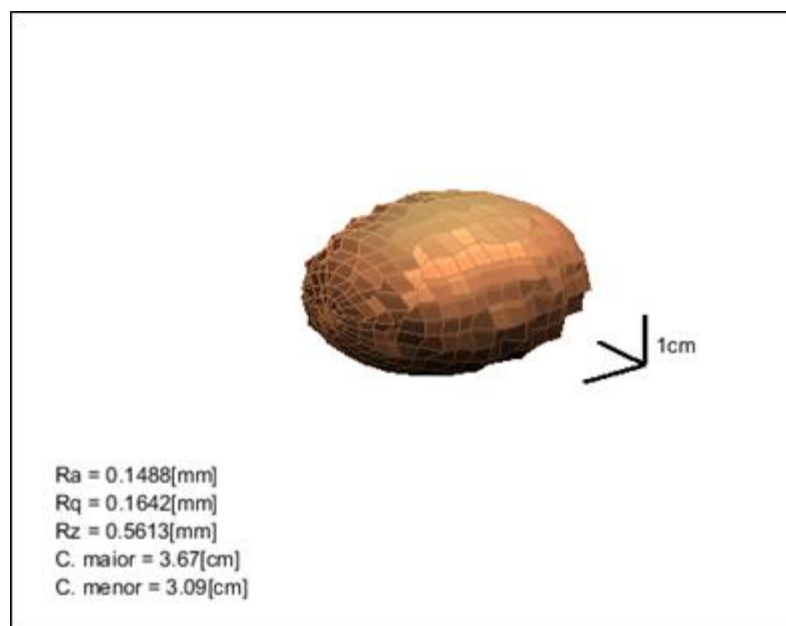


Figura 17: Representação gráfica de célula-filha de *Saccharomyces cerevisiae* à pressão ambiente. Aumento de dez mil vezes. C. maior: comprimento maior. C. menor: comprimento menor

Por fim, a figura 18 traz a representação de uma célula-filha de levedura após receber o tratamento por HHP de 100 MPa.

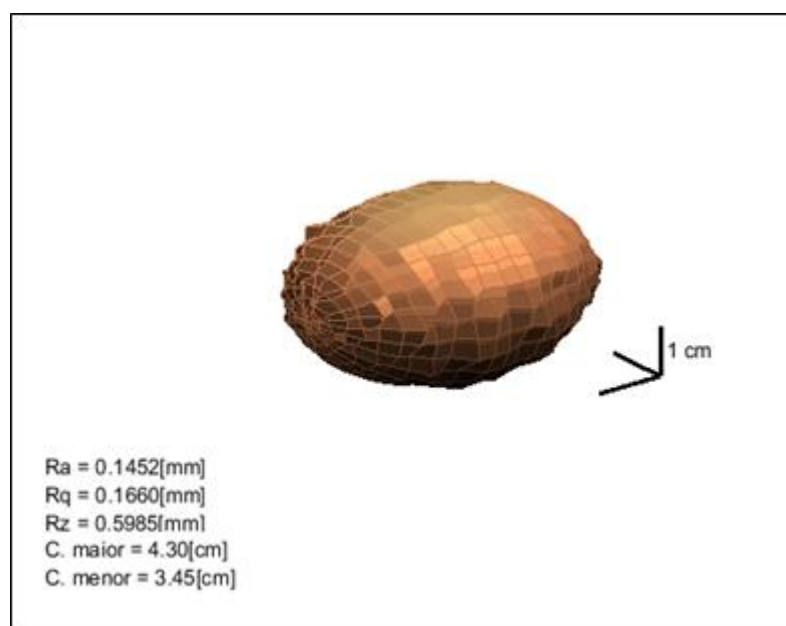


Figura 18: Representação gráfica de célula-filha de *S. cerevisiae* após estresse por alta pressão hidrostática de 100 MPa por 30 min. Aumento de dez mil vezes. C. maior: comprimento maior. C. menor: comprimento menor

Comparando as imagens (figuras 15-18), as células-mães e filhas de *S. cerevisiae* apresentam médias de rugosidade próximas, representadas nas figuras por Ra, Rz e Rq. Apesar disso, as células-mães apresentam médias de rugosidade ligeiramente mais elevada do que as filhas, porém ao observar as imagens, as células-filhas parecem ser mais rugosas. Isso é devido às dimensões das células-filhas, que são menores em comprimento do que as mães, deixando-as visualmente mais rugosas. Além disso, as mesmas imagens mostram que células-mães após a aplicação do tratamento por HHP de 100 MPa se mostram menos rugosas do que seu controle, enquanto que as células-filhas, após o mesmo estresse, são mais rugosas do que à 0,1 MPa. No entanto, vale destacar novamente que essa representação, apesar de ter sido feita com base em médias calculadas através dos dados coletados, não representam de forma fiel a realidade, visto que os valores de rugosidade obtidos através das leituras eram muito variáveis.

Apesar disso, o programa desenvolvido foi muito eficaz, mostrando de forma simples, muito visual e impactante dados que, antes, eram apenas numéricos e revelando como a biotecnologia pode agrupar diversas ferramentas e áreas do conhecimento, de uma forma tão harmoniosa.

5 CONCLUSÃO

Com os dados obtidos neste trabalho foi possível observar que o estresse de alta pressão hidrostática afeta de maneira diferente as células-mães e filhas de *Saccharomyces cerevisiae* e isso pode ser devido tanto à própria composição da parede celular dessas leveduras, quanto a fatores moleculares envolvidos na resposta ao estresse. As células-mães mostraram sofrer menos os efeitos do tratamento por alta pressão hidrostática do que as células-filhas, uma vez que permaneceram com a uniformidade da rugosidade de sua parede celular semelhante tanto à pressão ambiente, quanto após a aplicação de alta pressão hidrostática, o que pode indicar que as células-mães tornam-se adaptadas ao estresse sofrido, mantendo a integridade da sua estrutura celular. Dessa forma, esta seria mais uma evidência dos efeitos do estresse na longevidade celular.

Dessa forma, a utilização da microscopia de força atômica se mostra mais uma vez uma ferramenta poderosa nos estudos em biotecnologia, uma vez que foi capaz de fornecer, pela primeira vez, dados precisos de *S. cerevisiae* com diferentes idades submetidos ao estresse de alta pressão hidrostática. O protocolo proposto neste trabalho para separação das células e para análise no AFM foi eficiente, resultando em boas imagens. Alguns cuidados devem ser observados, como buscar obter imagens com maior aumento, visto que elas apresentam maior sensibilidade aos detalhes da amostra.

Este trabalho também abre novos caminhos para outras pesquisas em biotecnologia envolvendo a microscopia de força atômica e células-mães e filhas de *S. cerevisiae*, como a associação de manipulações genéticas e análise morfológica ao AFM ou ainda a investigação da resistência da parede celular desses grupos de células, sendo, para isso, necessária a utilização das leveduras em meio líquido. Os resultados deste trabalho somados a novas pesquisas, irão auxiliar na elucidação dos mecanismos utilizados pelas células de *S. cerevisiae* na resposta ao estresse e até mesmo poderão direcionar soluções para problemas encontrados na área da biotecnologia, seja na área da saúde, como também solucionando gargalos encontrados pela indústria na produção de bebidas e biocombustíveis.

REFERÊNCIAS

ADAMS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**. v. 150, pp. 2029–2035. 2004.

AERTSEN, A.; MEERSMAN, F.; HENDRICKX, M.E.G.; VOGEL, R.F.; MICHIELS, C.W. Biotechnology under high pressure: applications and implications. **Trends in Biotechnology**. v. 27, n. 7, pp. 434-441. 2009.

AGARWAL, G.; NOCERA, T.M. Atomic force microscopy. In: XIE Y. (Org.). **The nanobiotechnology handbook**. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 369-391. 2013.

AMORIM, B.A. **Efeito da longevidade na resposta a alta pressão hidrostática de *Saccharomyces cerevisiae***. 60f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2016.

ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**. v. 15, pp. 1351-1357. 1997.

BITTERMAN, K.J.; MEDVEDIK, O.; SINCLAIR, D.A. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 3, pp. 376-399. Set. 2003.

BRAVIM, F. **Resposta de *Saccharomyces cerevisiae* ao estresse de alta pressão hidrostática**. 156f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2011.

BRAVIM, F.; FERNANDES, P.M.B. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*. In: FERNANDES, P.M.B. (Org.); FERNANDES, A.A.R.; GHELFI, A.; PADDON, C.; ABBOTT, D.; BELLISSIMI, E.; BRAVIM, F. KEALEY, J. GALAZZO, J.; ZAHN, K.; BENJAMIN, K.; DI CIERO, L. **Levedura: Do pão à Biotecnologia**. Vitória, ES: EDUFES. pp. 35-51. 2009.

BRAVIM, F.; FREITAS, J.M.; FERNANDES, A.A.R.; FERNANDES, P.M.B. High hydrostatic pressure and the cell membrane stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of The New York Academy of Sciences**. v. 1189. pp. 127–132. 2010.

BRUL, S.; ROMMENS, A.J.M.; VERRIPS, C.T. Mechanistic studies on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high pressure. **Innovative Food Science; Emerging Technologies**. v. 1, pp. 99-108. 2000.

CAMERONI, E.; STETTLER, K.; SUTER, B. On the traces of XPD: cell cycle matters - untangling the genotype-phenotype relationship of XPD mutations. **Cell Division**. v. 5, n. 24, pp. 1-19. 2010.

CAVALIERI, D.; McGOVERN, P.E.; HARTL, D.L.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. **Journal of Molecular Evolution**. v. 57, pp. S226-S232. 2003.

COSTA, C.A.R.; RIPPEL, M.M.; GALEMBECK, F. Heterogeneidade da capacidade dissipativa e do módulo de Young em superfícies poliméricas: contraste de fase em AFM com contato periódico. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 12, n. 3, pp. 188-192. 2002.

DAGUE, E.; BITAR, R.; RANCHON, H.; DURAND, F.; YKEN, H.M.; FRANÇOIS, J.M. An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. **Yeast**. v. 27, pp. 673-684. 2010.

DE NOBEL, J.G.; KLIS, F.M.; PRIEM, J.; MUNNIK, T.; VAN DEN END, H. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 6, pp. 491-499. 1990.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras – Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 60. 2007.

DOKTYCZ, M.J.; SULLIVAN, C.J.; MORTENSEN, N.P.; ALLISON, D.P. Microbial cell imaging using atomic force microscopy. In: DUFRÊNE, Y.F. (Org.) **Life at the nanoscale: Atomic force microscopy of live cells**. Singapura: Pan Stanford Publishing. pp. 444. 2011.

DRANGINIS, A.M.; RAUCEO, J.M.; CORONADO, J.E.; LIPKE, P.N. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 71, n. 2, pp. 282-294. 2007.

DUFRÊNE, Y.F. Atomic force microscopy and chemical force microscopy of microbial cells. **Nature protocols**. v. 3, n. 7, pp. 1132-1138. 2008.

_____. Atomic force microscopy of fungal cell walls: an update. **Yeast**. v. 27, pp. 465-471. 2010.

FABRIZIO, P.; LONGO, V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Aging Cell**. v. 2, pp. 73-81. 2003.

FERNANDES, A.A.R.; PADDON, C.; ABBOTT, D.; BELLISSIMI, E.; KEALEY, J. GALAZZO, J.; DI CIERO, L.; FERNANDES, P.M.B. *Saccharomyces cerevisiae* como uma fábrica microbiana. In: FERNANDES, P.M.B. (Org.); FERNANDES, A.A.R.; GHELFI, A.; PADDON, C.; ABBOTT, D.; BELLISSIMI, E.; BRAVIM, F. KEALEY, J. GALAZZO, J.; ZAHN, K.; BENJAMIN, K.; DI CIERO, L. **Levedura: Do pão à Biotecnologia**. Vitória, ES: EDUFES. pp. 81-107. 2009.

FERNANDES, P.M.B. How does yeast respond to pressure? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, pp. 1239-1245. 2005.

_____. *Saccharomyces cerevisiae* response to high hydrostatic pressure. In: MICHELIS, C.; BARTLETT, D.H.; AERTSEN, A. **High-pressure microbiology**. Cambridge: American Society for Microbiology. pp. 145-166. 2008.

FERNANDES, P.M.B.; DOMITROVIC, T.; KAO, C.M.; KURTENBACH, E. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS Letters**. v. 556, pp. 153-160. 2004.

FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**. v. 29, n. 1, pp. 137-142. 2006.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V.D. Dietary restriction, growth factors and aging: from yeast to humans. **Science**. v. 328, n.5976, pp. 321–326. Abr, 2010.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. **Science**. v. 247, n. 5287, pp. 546-567. 1996.

GUSTAFSSON, J.; LEHTO, J.H.; TIENVIERI, T.; CIOVICA, L.; PELTONEN, J. Surface characteristics of thermomechanical pulps; the influence of defibration temperature and refining. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 225, pp. 95-104. 2003.

HERRMANN, P.S.P; SILVA, M.A.P.; BERNARDES-FILHO, R.; JOB, A.E.; COLNAGO, L.A.; FROMMER, J.E.; MATTOSO, L.H.C. Microscopia de Varredura por Força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 7, pp. 51-61. Out/Dez, 1997.

HOHMANN, S.; MAGER, S.H. Introduction. In: HOHMANN, S.; MAGER, S.H. (Org.) **Yeast Estress Responses**, Topics in Current Genetics. Berlim: Springer-Verlag. v. 1. pp. 1-9. 2003.

KAEBERLEIN, M. Lessons on longevity from budding yeast. **Nature**. v. 464, pp. 513-519. 2010.

KAEBERLEIN, M.; KIRKLAND, K.T.; FIELDS, S.; KENNEDY, B.K. Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 126, pp. 491–504. 2005.

KARREMAN, R.J.; DAGUE, E.; GABORIAUD, F.; QUILÈS, F.; DUVAL, J.F.L.; LINDSEY, G.G. The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1774, pp. 131-137. 2007.

KAWARAI, T.; ARAI, S.; FURUKAWA, S.; OGIHARA, H.; YAMASAKI, M. High-Hydrostatic-Pressure Treatment impairs actin cables and budding in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience And Bioengineering**. v. 101, n. 6, pp. 515-518. 2006.

KIRKWOOD, T.B.L; AUSTAD, S.N. Why do we age? **Nature**. v. 408, pp. 233-238. 2000.

KLIS, F.M.; Boorsma, A. De Groot, P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 2, pp. 185–202. 2006.

KOURTIS, N.; TAVERNARAKIS, N. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. **European Molecular Biology Organization Journal**. v. 30, pp. 2520–2531. 2011.

LANDRY, C.R.; TOWNSEND, J.P.; HARTL, D.L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**. v. 15. pp. 575-591. 2006.

LESAGE, G.; BUSSEY, H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 70, n. 2, pp. 317-343. 2006.

LINDSTROM, D.L.; GOTTSCHLING, D.E. The mother enrichment program: a genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. v. 183, n. 2, pp. 413-422. Out. 2009.

MARCHIORI, M.M. **Estudo de um sistema de medição a laser na análise da textura da superfície gerada por torneamento**. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

MARSIT, S.; DEQUIN, S. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. **FEMS Yeast Research**. v. 15, n. 7, pp. 1-12. 2015.

MARX, G.; MOODY, A.; BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. **International Journal of Food Microbiology**. v. 151, pp. 327-337. 2011.

MCLEAN, R.S.; SAUER, B.B. Tapping-mode AFM studies using Phase detection for resolution of nanophases in segmented polyurethanes and other block copolymers. **Macromolecules**. v. 30, pp. 8314-8317. 1997.

MEERSMAN, F.; HEREMANS, K. High Hydrostatic Pressure Effects in the Biosphere: from Molecules to Microbiology. In: MICHELIS, C.; BARTLETT, D.H.; AERTSEN, A. **High-pressure microbiology**. Cambridge: American Society for Microbiology. pp. 1-17. 2008.

MOTSHWENE, P.; KARREMAN, R.; KGARI, G.; BRANDT, W.; LINDSEY, G. LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**. v.377, pp. 769-774. 2004.

MÜLLER, D.J.; DUFRÊNE, Y.F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. **Trends in Cell Biology**. v. 21, n. 8, pp. 461-469. Ago. 2011.

OLIVEIRA, R.R.L.; ALBUQUERQUE, D.A.C.; CRUZ, T.G.S.; YAMAJI, F.M.; LEITE, F.L. Measurement of the nanoscale roughness by atomic force microscopy: basic principles and applications. In: BELLITO, V. (Org.) **Atomic Force Microscopy - Imaging, measuring and manipulating surfaces at the atomic scale**. InTech. pp. 147-174. 2012.

ORLEAN, P. Biogenesis of yeast wall and surface components. In: PRINGLE, J.R.; BROACH, J.R.; JONES, E.W. **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces* – cell cycle and cell biology**. Monograph 21. EUA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v. 3, pp. 229-362. 1997

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron**. v. 29, n. 2/3, pp. 207-233. 1998.

PALHANO, F.L.; FOGUEL, D.; LINDSEY, G.G; FERNANDES, P.M.B. Changes in transcription and protein profile induced by high hydrostatic pressure treatment in micro-organisms. **Current Proteomics**. n. 5, pp. 138-145. 2008.

PALHANO, F.L.; GOMES, H.L.; ORLANDO, M.T.D.; KURTENBACH, E.; FERNANDES, P.M.B. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cellular and Molecular Biology**. v. 50, n. 4, pp. 447-457. 2004.

PARRA, B.S; GENNARI, R.C.; MELCHIADES, F.G.; BOSCHI, A.O. Rugosidade superficial de revestimentos cerâmicos. **Cerâmica industrial**. v. 11, n. 2, pp. 15-18. Mar/abr, 2006.

RAPOSO, M.; FERREIRA, Q.; RIBEIRO, P.A.; A guide for atomic force microscopy analysis of soft-condensed matter. In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DÍAZ, J. (Orgs). **Modern research and educational topics in microscopy**. Espanha: Formatex. Microscopy Series, v. 1, 3ª ed., pp. 758-769. 2007.

RUIZ-HERRERA, J. **Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2ª ed. pp. 203. 2012.

SÁNCHEZ, M.S.; MATEO, J.M.; COLOMER, F.J.R.; RIBELLES, J.L.G. Nanoindentation and tapping mode AFM study of phase separation in poly(ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymer networks. **European Polymer Journal**. v. 42, pp. 1378-1383. 2006.

SHIMADZU CORPORATION. Q1-5: What can be determined from the SPM phase mode? Disponível em: <<http://www.shimadzu.com/an/surface/spm/faq1.html#faq1-5>>, acessado em: 10 abr. 2017.

TOUHAMI, A.; NYSTEN, B.; DUFRÊNE, Y.F. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. **Langmuir**. v. 19, pp. 4539-4543. 2003.

WALKER, G.M.; WHITE, N.A. Introduction to Fungal Physiology. KAVANAGH, K. (Org.) **Fungi: Biology and applications**. Chichester: John Wiley; Sons, Ltd., 2ª ed., pp. 1-35. 2011.

WEST, P.E. **Introduction to atomic force microscopy – Theory, practice, applications**. pp. 1-16. 2006. Disponível em: <<http://www.paulwestphd.com/download.html>>, acessado em: 12 jul. 2016.

APÊNDICE A – Tabela com dados brutos de rugosidade de lamínula de vidro

Tabela A-1: Valores de rugosidade e variação relativa de rugosidade de lamínula de vidro (continua)

Medições	Ra (nm)										Variação de Ra (%)
	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10	
1	37,19	36,86	36,32	36,91	36,84	36,91	37,05	36,95	37,01	37,01	2,34
2	37,43	37,24	37,35	37,79	37,74	37,49	37,57	37,46	37,64	37,78	1,46
3	35,21	34,67	34,75	34,69	34,78	34,61	34,70	34,48	34,61	34,72	2,07

Tabela A-1: Valores de rugosidade e variação relativa de rugosidade de lamínula de vidro (continua)

Medições	Rz (nm)										Variação de Rz (%)
	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10	
1	150,25	146,08	143,51	144,39	144,79	144,39	146,28	146,58	147,87	145,98	4,49
2	151,84	149,95	149,16	149,55	151,74	150,94	149,55	150,45	150,55	151,74	1,77
3	133,76	135,16	134,36	134,96	142,31	132,77	136,74	138,33	132,87	137,14	6,70

Tabela A-1: Valores de rugosidade e variação relativa de rugosidade de lamínula de vidro (conclusão)

Medições	Rq (nm)										Variação de Rq (%)
	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10	
1	43,02	42,64	41,69	42,64	42,52	42,64	42,71	42,69	42,74	42,78	3,09
2	43,68	43,44	43,53	43,94	43,99	43,68	43,66	43,60	43,74	43,92	1,25
3	40,13	40,04	40,13	40,03	40,19	39,93	39,97	39,91	39,99	40,14	0,70

APÊNDICE B – Utilização de modo fase em *Saccharomyces cerevisiae*

Imagens de modo fase também foram feitas no desenvolvimento deste trabalho e como já foi abordado, essas imagens apresentam excelente contraste, destacando de forma qualitativa diferenças na composição química da superfície analisada. As diferentes tonalidades que a imagem apresenta são descritas na literatura como regiões de características viscoelásticas diferentes (COSTA et al., 2002; SÁNCHEZ et al., 2006; SHIMADZU, 2017) ou mesmo regiões de carácter hidrofóbico ou hidrofílico (GUSTAFSSON et al, 2003). Contudo, a relação entre qual tonalidade representa regiões macias ou rígidas ou ainda hidrofóbicas ou hidrofílicas podem variar dependendo da forma como os parâmetros de controle do equipamento são acionados antes do início da leitura (COSTA et al., 2002).

Apesar disso, a utilização de imagens de modo fase seria importante, por exemplo, caso houvesse ocorrência constante de pontos mais claros ou mais escuros em uma mesma região da levedura, levando a uma investigação mais aprofundada do fenômeno. Para tanto, como é possível observar na figura 9, quanto maior for o aumento das imagens, melhor será a definição dessas diferenças de contraste (GUSTAFSSON et al, 2003). No entanto, como nem todas as imagens deste trabalho puderam ter aumento maior do que o de 30x30 µm, devido a dificuldades técnicas, esse tipo de visualização foi mais difícil, sendo esta, então, uma das razões pelas quais as imagens de modo fase não foram utilizadas como dado deste trabalho.

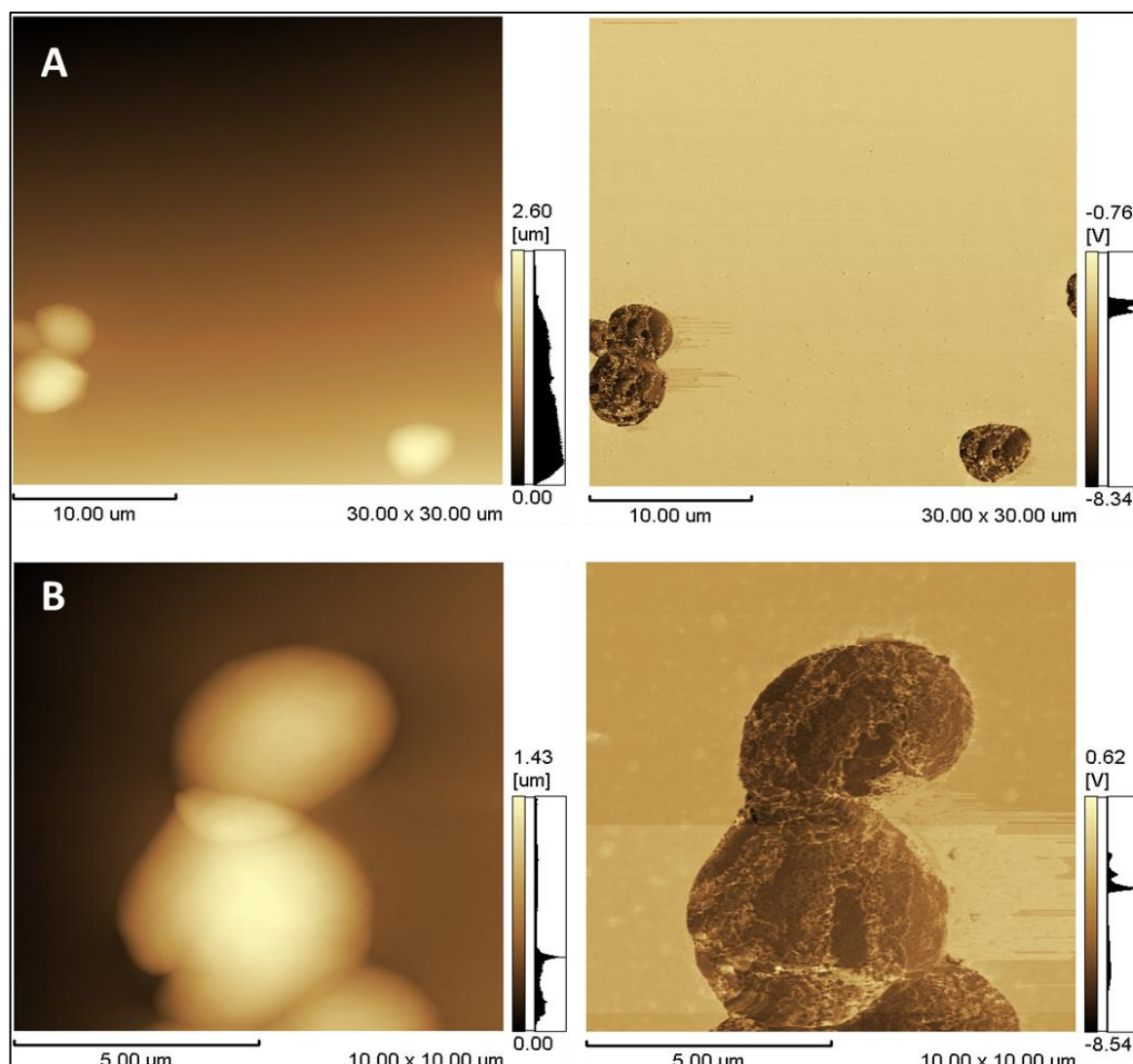


Figura B-1: Diferenças na visualização de detalhes das imagens de modo fase com aumentos distintos. Imagens com aumento maior (B) revelam mais detalhes do que imagens com aumento menor (A). À esquerda: imagens de altura e à direita: imagens de modo fase

Outra razão pela qual as imagens de modo fase não foram utilizadas foi pelo fato de que em várias imagens a leitura em modo fase não foi efetiva, uma vez que não houve a diferenciação entre regiões claras e escuras (figura 10), mesmo quando a leitura foi interrompida e reiniciada. No entanto, o motivo desses eventos é desconhecido, sendo necessária investigação das causas dessas falhas e testes futuros.

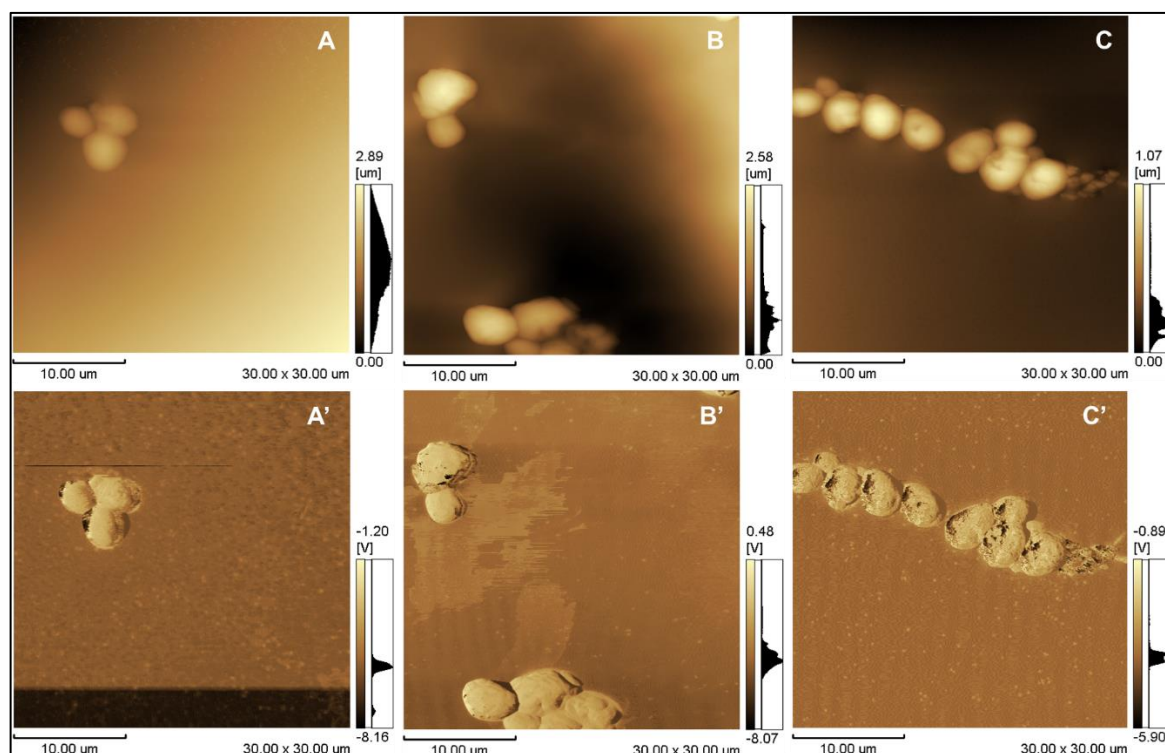


Figura 19B-2: Imagens de modo fase que não tiveram boa leitura. Em A, B e C: imagens topográficas de altura e em A', B' e C' suas respectivas imagens de fase

APÊNDICE C – Tabela com dados brutos de rugosidade de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Tabela C-1: Valores de rugosidade, variação relativa e médias de rugosidade de células-mãe sem tratamento por HHP (continua)

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Ra (nm)										Variação de Ra (%)	Média individual Ra (nm)
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10		
24/nov	5,02	2,72	72,19	74,93	87,78	89,18	82,21	75,49	70,64	62,72	61,31	57,51	35,51	73,40
06/dez	4,28	3,17	117,49	137,20	143,22	147,09	151,30	153,45	157,18	156,50	152,15	147,54	25,25	146,31
06/dez	4,66	3,88	195,28	200,22	200,95	196,33	190,38	190,53	186,87	216,87	185,89	186,10	14,29	194,94
08/dez	4,73	3,01	109,66	104,88	97,57	99,82	103,21	105,49	106,88	95,73	86,74	91,35	20,90	100,13
21/mar	4,81	3,44	180,09	177,40	182,41	173,37	154,92	156,62	169,40	144,90	111,04	80,91	55,64	153,11
21/mar	5,23	3,78	152,50	143,26	139,99	143,99	149,80	153,09	158,16	157,27	164,69	176,47	20,67	153,92
21/mar	5,16	4,74	159,53	157,75	154,33	148,55	144,72	145,40	138,02	135,89	139,25	145,44	14,82	146,89
21/mar	4,90	4,25	161,91	158,52	138,86	132,80	127,82	135,41	147,41	164,84	172,70	171,75	25,99	151,20
21/mar	4,80	2,55	94,95	101,99	116,04	125,18	124,26	124,84	119,53	120,87	122,91	118,46	24,15	116,90
21/mar	5,25	4,30	155,37	149,12	143,86	138,00	145,59	137,45	149,75	166,06	206,02	238,19	42,29	162,94
21/mar	3,88	4,48	114,96	126,39	121,59	114,02	100,67	101,22	110,59	110,92	115,73	123,02	20,35	113,91
Média total														137,61

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Rz (nm)										Variação de Rz (%)	Média individual Rz (nm)	
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10			
24/nov	5,02	2,72	282,71	290,07	378,65	376,07	365,74	319,76	257,20	255,32	307,55	244,09	35,54	307,72	
06/dez	4,28	3,17	397,42	509,84	559,69	601,49	616,99	610,43	603,68	574,09	562,47	569,32	35,59	560,54	
06/dez	4,66	3,88	818,97	821,16	783,03	787,92	743,90	801,40	724,63	720,56	725,03	749,06	12,25	767,57	
08/dez	4,73	3,01	448,37	457,50	481,04	519,17	580,84	670,81	757,31	796,53	765,75	545,78	43,71	602,31	
21/mar	4,81	3,44	741,32	755,22	760,68	785,71	732,48	723,04	684,61	559,29	475,08	338,04	56,98	655,55	
21/mar	5,23	3,78	605,76	571,60	557,50	556,21	577,46	576,57	632,08	636,25	618,48	632,18	12,58	596,41	
21/mar	5,16	4,74	695,54	714,70	675,87	617,88	686,50	705,87	630,49	597,32	554,62	631,68	22,40	651,05	
21/mar	4,90	4,25	677,27	668,53	584,91	529,40	524,04	598,42	677,27	742,21	747,08	696,63	29,85	644,58	
21/mar	4,80	2,55	403,48	402,09	492,26	557,30	568,03	551,64	512,72	472,20	490,57	452,93	29,21	490,32	
21/mar	5,25	4,30	596,63	615,70	549,66	532,78	629,00	591,66	663,56	727,91	813,31	879,25	39,41	659,95	
21/mar	3,88	4,48	529,80	622,85	612,82	594,54	504,18	503,18	520,26	480,34	472,89	508,94	24,08	534,98	
Média total															588,27

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Rq (nm)										Variação de Rq (%)	Média individual Rq (nm)
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10		
24/nov	5,02	2,72	82,20	85,30	101,44	106,12	99,64	89,82	81,52	71,92	76,56	71,09	33,01	86,56
06/dez	4,28	3,17	132,93	160,21	168,05	174,04	178,77	179,40	182,84	180,04	173,91	167,39	27,30	169,76
06/dez	4,66	3,88	229,30	233,34	233,59	228,95	221,71	222,68	217,23	216,87	216,69	217,33	7,23	223,77
08/dez	4,73	3,01	125,62	123,46	119,46	124,00	131,75	145,48	159,34	154,87	137,91	116,17	27,09	133,81
21/mar	4,81	3,44	222,64	219,37	221,70	211,57	193,58	194,88	204,88	173,14	138,01	97,39	56,26	187,72
21/mar	5,23	3,78	177,93	167,66	164,06	166,72	171,59	175,65	182,75	183,14	189,11	201,02	18,39	177,96
21/mar	5,16	4,74	190,62	191,44	185,66	175,82	174,66	179,42	166,63	161,17	164,00	172,18	15,81	176,16
21/mar	4,90	4,25	189,91	186,06	163,11	155,05	149,65	160,96	178,24	198,20	206,49	203,33	27,53	179,10
21/mar	4,80	2,55	111,55	119,45	139,27	151,61	151,27	152,10	141,33	140,08	142,13	135,39	26,66	138,42
21/mar	5,25	4,30	180,55	173,15	167,25	161,36	177,16	166,58	186,54	207,76	249,47	279,87	42,34	194,97
21/mar	3,88	4,48	147,17	159,31	154,39	146,52	126,22	125,39	133,38	131,53	137,17	145,42	21,29	140,65
Média total														164,44

Tabela C-2: Valores de rugosidade, variação relativa e médias de rugosidade de células-mãe após tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min (continua)

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Rz (nm)										Variação de Rz (%)	Média individual Rz (nm)
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10		
24/nov	4,17	3,51	496,03	503,98	443,60	415,10	365,35	385,60	396,83	425,72	431,98	459,39	27,50	432,36
06/dez	4,92	3,06	434,56	516,09	557,40	562,57	614,11	611,82	608,84	525,82	529,20	548,17	29,23	550,86
06/dez	5,17	4,60	692,06	792,26	842,81	766,54	756,41	683,82	697,62	632,58	663,46	652,14	24,94	717,97
06/dez	3,99	3,31	544,99	569,32	541,71	573,79	598,02	620,36	608,55	597,82	574,09	453,63	26,87	568,23
08/dez	4,60	4,52	708,94	760,68	644,20	713,11	782,23	834,96	928,21	983,33	1010,00	947,48	36,21	831,31
08/dez	4,24	3,50	444,00	459,88	529,40	581,53	549,06	589,18	591,76	577,66	527,61	475,87	24,96	532,60
08/dez	4,88	4,17	594,74	615,30	660,38	659,69	670,71	620,16	744,20	705,87	690,27	634,36	20,08	659,57
08/dez	4,47	3,95	493,35	547,77	580,44	581,53	566,84	566,44	599,61	544,00	537,84	487,00	18,78	550,48
08/dez	5,15	3,33	311,52	327,71	314,50	307,85	263,76	241,71	243,10	254,52	252,63	260,58	26,24	277,79
11/mar	4,96	3,53	508,94	420,36	336,05	360,58	416,79	443,30	450,95	404,57	430,19	406,26	33,84	417,80
11/mar	5,05	2,93	404,27	331,28	373,19	446,78	440,42	423,34	377,26	371,50	404,67	263,76	40,96	383,65
Média total														538,42

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Ra (nm)										Variação de Ra (%)	Média individual Ra (nm)
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10		
17/jan	3,25	3,01	133,86	183,86	192,03	191,61	175,54	162,94	155,29	135,22	101,43	92,53	51,81	152,43
17/jan	3,36	3,01	108,35	128,50	144,46	156,56	168,19	166,91	169,37	165,47	162,49	153,63	36,03	152,39
17/jan	4,32	3,53	151,97	167,77	167,98	167,62	158,96	154,67	150,62	147,51	160,21	141,37	15,84	156,87
17/jan	4,24	3,27	173,86	186,53	190,78	184,38	182,67	188,88	186,17	179,86	170,68	162,75	14,69	180,66
17/jan	3,22	2,69	112,12	153,16	168,65	180,93	191,74	203,30	203,84	208,61	207,56	136,67	46,25	176,66
24/jan	4,19	2,83	108,06	111,14	108,44	108,10	112,07	115,46	123,60	125,72	110,12	87,89	30,09	111,06
24/jan	3,82	3,05	128,18	138,48	136,35	122,60	117,11	96,57	96,95	110,70	102,94	90,06	34,97	113,99
28/jan	3,97	3,49	102,62	114,12	125,89	137,47	157,85	156,40	170,53	171,60	169,44	143,86	40,20	144,98
28/jan	3,88	3,04	146,04	151,12	159,32	159,98	160,41	163,61	161,81	147,35	120,20	77,38	52,70	144,72
28/jan	4,57	2,88	148,35	128,88	121,72	122,28	121,45	130,03	131,93	117,87	99,41	109,98	32,99	123,19
28/jan	3,71	3,23	101,17	92,87	115,55	122,01	138,57	155,57	161,94	179,80	191,52	177,66	51,51	143,67
Média total														145,51

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Rz (nm)										Variação de Rz (%)	Média individual Rz (nm)	
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10			
17/jan	3,25	3,01	443,10	571,80	645,29	655,52	625,23	563,26	544,29	447,17	353,63	348,46	46,84	519,78	
17/jan	3,36	3,01	372,89	433,37	499,41	548,76	586,90	575,38	581,93	572,89	548,76	494,24	36,46	521,45	
17/jan	4,32	3,53	640,62	754,43	751,74	759,49	696,43	617,19	597,25	582,23	546,18	600,37	28,09	654,59	
17/jan	4,24	3,27	609,74	662,96	910,63	897,23	888,09	924,54	968,53	996,63	931,79	808,35	38,82	859,85	
17/jan	3,22	2,69	355,81	475,58	512,52	564,75	593,55	600,10	589,08	607,06	639,33	506,26	44,35	544,40	
24/jan	4,19	2,83	367,23	425,13	454,32	466,34	473,49	464,95	499,51	462,57	384,41	312,91	37,36	431,09	
24/jan	3,82	3,05	413,71	476,67	519,47	525,13	483,12	469,82	436,65	491,86	446,78	368,72	29,79	463,19	
28/jan	3,97	3,49	417,28	559,69	560,68	655,42	724,44	705,07	690,97	636,35	559,29	478,36	42,40	598,76	
28/jan	3,88	3,04	486,20	583,62	627,31	638,54	643,90	630,89	581,14	509,54	425,03	314,30	51,19	544,05	
28/jan	4,57	2,88	590,57	514,01	528,21	505,76	510,33	556,21	547,87	521,75	466,44	416,89	29,41	515,80	
28/jan	3,71	3,23	451,74	482,73	544,79	587,10	599,91	603,18	598,32	564,45	508,64	454,82	25,11	539,57	
Média total															562,96

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Rq (nm)										Variação de Rq (%)	Média individual Rq (nm)
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10		
17/jan	3,25	3,01	147,37	200,58	216,95	218,82	199,95	180,78	173,84	149,23	112,97	108,43	50,45	159,94
17/jan	3,36	3,01	119,67	140,96	159,27	173,38	186,70	183,99	187,78	182,60	178,24	167,26	36,27	156,01
17/jan	4,32	3,53	179,35	198,68	196,32	195,79	183,09	175,86	171,80	168,95	160,21	161,51	19,36	164,63
17/jan	4,24	3,27	197,27	214,14	229,21	221,36	219,68	229,28	233,30	230,80	219,74	212,88	15,44	202,10
17/jan	3,22	2,69	121,91	166,96	183,56	198,43	210,20	220,94	221,97	227,89	228,15	164,79	46,57	194,48
24/jan	4,19	2,83	122,88	128,84	127,72	127,66	132,74	135,13	143,92	143,30	123,60	101,44	29,52	128,72
24/jan	3,82	3,05	141,71	157,52	160,06	146,32	135,43	118,36	114,95	131,96	123,86	106,55	33,43	133,67
28/jan	3,97	3,49	123,60	140,45	152,46	167,12	195,53	186,79	202,92	197,82	189,81	160,29	39,09	171,68
28/jan	3,88	3,04	167,08	179,71	185,15	185,70	184,92	187,80	183,86	166,05	135,02	91,00	51,54	166,63
28/jan	4,57	2,88	175,69	153,92	146,12	146,33	145,56	156,22	157,55	140,61	193,66	203,72	30,98	161,94
28/jan	3,71	3,23	128,51	123,64	150,46	158,51	176,05	191,09	193,66	203,72	206,77	186,58	40,20	171,90
Média total														164,70

Tabela C-4: Valores de rugosidade, variação relativa e médias de rugosidade de células-filhas após tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min (continua)

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Ra (nm)										Variação de Ra (%)	Média individual Ra (nm)
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10		
13/dez	4,25	3,54	119,64	138,12	141,19	141,72	146,01	147,77	139,04	135,16	134,65	136,31	19,04	137,96
13/dez	3,70	2,94	108,88	121,67	132,57	137,73	151,52	149,83	150,33	159,33	149,72	129,46	31,66	139,10
13/dez	4,17	2,74	176,78	170,88	163,86	153,68	149,08	154,57	156,65	161,90	174,41	175,33	15,67	163,71
13/dez	3,36	3,56	104,41	120,60	135,32	134,27	144,59	151,88	164,90	159,97	163,41	160,54	36,68	143,99
17/jan	4,89	3,20	126,84	124,59	122,20	144,48	103,81	103,49	102,05	86,56	88,77	91,59	40,09	109,44
24/jan	4,37	3,04	195,63	209,25	225,21	198,20	159,31	155,95	159,93	162,76	158,05	144,57	35,81	176,89
24/jan	4,50	4,10	138,95	163,34	148,90	161,18	161,01	160,97	152,58	181,66	191,11	194,11	28,42	165,38
24/jan	4,82	4,12	125,95	124,55	116,20	128,35	147,81	147,08	149,72	157,04	162,81	157,25	28,63	141,68
24/jan	4,23	4,19	112,14	136,81	137,53	155,84	147,32	151,73	145,84	145,84	158,64	171,23	34,51	146,29
24/jan	5,28	2,89	87,61	70,11	69,76	72,07	74,49	83,07	84,67	83,33	68,89	40,71	53,53	73,47
24/jan	3,74	3,67	144,65	150,8	153,74	176,67	153,89	121,09	136,63	136,18	130,18	126,66	31,46	143,05
Média total														140,09

Tabela C-4: Valores de rugosidade, variação relativa e médias de rugosidade de células-filhas após tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min (continua)

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Rz (nm)										Variação de Rz (%)	Média individual Rz (nm)
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10		
13/dez	4,25	3,54	407,65	518,67	617,78	669,72	667,73	661,67	597,59	538,93	537,54	558,30	39,13	577,56
13/dez	3,70	2,94	415,50	483,82	546,28	574,48	585,80	577,76	567,43	543,90	497,12	395,24	32,53	518,73
13/dez	4,17	2,74	671,78	672,20	660,48	648,17	655,02	623,94	699,31	746,48	704,18	634,66	16,42	671,62
13/dez	3,36	3,56	353,73	475,77	558,69	577,26	626,52	635,76	682,63	667,14	669,02	619,17	48,18	586,57
17/jan	4,89	3,20	471,60	540,32	598,32	544,00	500,50	491,66	491,76	409,24	371,80	375,28	37,86	479,45
24/jan	4,37	3,04	842,31	931,49	997,43	937,64	763,66	755,02	754,72	752,14	730,00	617,98	38,04	808,24
24/jan	4,50	4,10	582,53	721,56	666,74	744,20	696,43	785,41	728,01	755,32	753,43	762,57	25,83	719,62
24/jan	4,82	4,12	599,91	578,46	494,44	468,13	621,95	579,55	597,82	656,71	647,37	635,95	28,72	588,03
24/jan	4,23	4,19	473,99	598,71	641,42	730,69	653,83	670,91	618,18	600,70	696,03	637,64	35,13	632,21
24/jan	5,28	2,89	352,54	298,71	318,97	316,79	282,62	235,52	337,34	347,87	265,25	264,55	33,19	302,02
24/jan	3,74	3,67	582,53	647,87	708,65	739,63	735,95	693,15	684,22	659,99	619,57	529,10	28,46	660,07
Média total														594,92

Tabela C-4: Valores de rugosidade, variação relativa e médias de rugosidade de células-filhas após tratamento por HHP de 100 MPa por 30 min (conclusão)

Data das imagens	Maior comprimento (um)	Menor comprimento (um)	Rq (nm)										Variação de Rq (%)	Média Rq (nm)
			Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8	Linha 9	Linha 10		
13/dez	4,25	3,54	136,29	163,18	169,65	170,00	172,35	174,00	160,43	155,71	156,50	162,37	21,67	162,05
13/dez	3,70	2,94	129,02	148,42	163,27	169,47	181,44	175,77	174,11	180,71	169,42	143,71	28,89	163,53
13/dez	4,17	2,74	203,49	195,59	188,15	178,88	175,75	180,65	186,08	196,98	209,81	201,72	16,23	191,71
13/dez	3,36	3,56	118,50	143,18	159,54	157,76	168,16	175,96	191,48	184,96	199,22	193,15	40,52	169,19
17/jan	4,89	3,20	144,66	124,59	150,56	140,77	128,28	127,42	126,51	104,76	103,89	105,98	31,00	125,74
24/jan	4,37	3,04	251,62	269,92	284,08	251,25	197,15	194,44	203,28	203,86	195,81	180,67	36,40	223,21
24/jan	4,50	4,10	169,31	197,18	175,78	191,93	188,14	195,06	183,59	213,14	224,30	223,49	24,52	196,19
24/jan	4,82	4,12	153,90	146,91	134,90	145,78	174,39	171,75	175,24	183,54	191,23	182,78	29,46	166,04
24/jan	4,23	4,19	129,23	160,29	166,14	188,86	176,39	180,72	173,03	172,74	191,94	197,89	34,70	173,72
24/jan	5,28	2,89	101,24	81,98	81,53	83,64	85,73	95,65	97,84	98,20	82,45	53,89	46,77	86,22
24/jan	3,74	3,67	179,36	189,41	197,98	219,68	198,89	163,86	177,99	175,29	167,66	155,75	29,10	182,59
Média total														167,29

APÊNDICE D – Código fonte do programa para representação gráfica da levedura

```
% UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
% PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
% ALUNA: LAUANDA MILANEZ CARVALHO
% OBJETIVO DO PROGRAMA: CRIAR UM MODELO PARA A LEVEDURA Saccharomyces
cerevisiae
% AUTOR: PETERSON DA SILVA CEZAR
% VITÓRIA, JULHO DE 2017.

close all
clear all
c_menor = 3.45; % comprimento menor da levedura
c_maior = 4.30; % comprimento maior da levedura
n=25;          % quantidade de seções do elipsóide
[x, y, z] = ellipsoid(0,0,0,c_menor/2,c_menor/2,c_maior/2,n); % gera um
elipsoide centrado na origem

%PARÂMETROS DE RUGOSIDADE DA LEVEDURA A SER REPRESENTADA
ra = 0.140;      %média
rq = 0.167;      %desvio padrão
rz = 0.594;      %média dos 5 maiores picos somada à média dos 5 maiores
vales

ruído = randn(n+1);
ruído_norm = ra + (rz/2)*ruído/(max(max(ruído))); %ruído aleatório para
simular a rugosidade
y_rugoso = y + ruído_norm;

erro = (y_rugoso-y);

%PARÂMETROS DE RUGOSIDADE DA LEVEDURA CRIADA COMPUTACIONALMENTE
Ra_calc = sum(sum(abs(erro)))/(length(x)^2)
Rq_calc = sqrt(sum(sum(erro.^2))/(length(x)^2))
Rz_calc = (max(max(erro)) + abs(min(min(erro))))

h = surf(z,y_rugoso,x,'FaceColor','texturemap');
title('Célula-filha, 100 MPa');

shading interp
hold on;
axis([-3 3 -3 3 -3 3]);
camlight
set(gca,'color','w')
set(gcf,'color','w')

x_ref(:,1) = (c_maior/2-1):0.1:c_maior/2;
x_ref(:,2) = -1*c_menor/2;
x_ref(:,3) = -1*c_menor/2;

y_ref(:,2) = (-1*c_menor/2):0.1:(-1*c_menor/2+1);
y_ref(:,1) = c_maior/2;
y_ref(:,3) = -1*c_menor/2;

z_ref(:,3) = (-1*c_menor/2):0.1:(-1*c_menor/2+1);
```



```

z_ref(:,1) = c_maior/2;
z_ref(:,2) = -1*c_menor/2;

plot3(x_ref(:,1),x_ref(:,2),x_ref(:,3),'k','LineWidth',2);
plot3(y_ref(:,1),y_ref(:,2),y_ref(:,3),'k','LineWidth',2);
plot3(z_ref(:,1),z_ref(:,2),z_ref(:,3),'k','LineWidth',2);

% Gera o sólido para reproduzir a cicatriz das células mãe
a_cicatriz = 0.5;
b_cicatriz = 0.5;
c_cicatriz = 0.5;
[x_cicatriz, y_cicatriz, z_cicatriz] = ellipsoid(0,0,(-
c_maior/2),a_cicatriz,b_cicatriz,c_cicatriz,15);
g = surf(z_cicatriz,y_cicatriz,x_cicatriz,'FaceColor','texturemap');
shading interp
camlight

%% PRODUZ UMA IMAGEM GIF DA LEVEDURA
teta = 0:pi/64:2*pi;
gif('mae_100MPa.gif','DelayTime',0.05)
for k=1:length(teta)
    for i=1:(n+1)
        for j=1:(n+1)
            z_rot(i,j) = [cos(teta(k)) sin(teta(k)) 0]*[z(i,j);
y_rugoso(i,j); x(i,j)];
            y_rot(i,j) = [-1*sin(teta(k)) cos(teta(k)) 0]*[z(i,j);
y_rugoso(i,j); x(i,j)];
            %z_rot(i,j) = [0 0 1]*[x(i,j); y_rugoso(i,j); z(i,j)];
        end
    end

    clear i j;
    for i=1:length(x_cicatriz)
        for j=1:length(x_cicatriz)
            z_cic_rot(i,j) = [cos(teta(k)) sin(teta(k))
0]*[z_cicatriz(i,j); y_cicatriz(i,j); x_cicatriz(i,j)];
            y_cic_rot(i,j) = [-1*sin(teta(k)) cos(teta(k))
0]*[z_cicatriz(i,j); y_cicatriz(i,j); x_cicatriz(i,j)];
        end
    end

    set(h,'Xdata',z_rot)
    set(h,'Ydata',y_rot)
    gif
end

```